

**GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE
ANALYSE
DER CYCLODEXTRIN-GLYCOSYL-
TRANSFERASE AUS KLEBSIELLA
PNEUMONIAE M5a1**

Florian Binder



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0014

GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE ANALYSE DER CYCLODEXTRIN-GLYCOSYL-

TRANSFERASE AUS KLEBSIELLA PNEUMONIAE M5a1

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Florian Binder
aus
Traunstein

Februar 1987

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Lubitz

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.1987

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	11
I. Verwendete Mikroorganismen und Plasmide	11
II. Kulturmedien	19
1. Vollmedium	19
2. Minimalmedien	19
3. DM 3-Regenerationsmedium	20
III. Anzuchtbedingungen	20
IV. Enzymologische und proteinchemische Methoden	21
1. Bestimmung der Aktivität von Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase	21
2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Protein	21
3. Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz	21
V. Immunologische Methoden	22
1. Präparation von anti-CGT-Antikörpern	22
2. Immunoblotting	23
VI. Genetische Methoden	23
1. UV-Mutagenese	23
2. Isolierung von DNS	23
3. Isolierung von RNS	24
4. Methoden zur in vitro Rekombination von DNS	25
5. Transformation von Bakterienzellen	27
6. Transfektion von E.coli-Zellen	27
7. Markierungen von DNS-Fragmenten mit ³² Phosphat	28

	Seite
8. Hybridisierungsexperimente	28
9. DNS-Sequenzierung	29
10. Bestimmung der Transkriptionsstartstelle mit Nuklease S1	30
11. Oligonukleotidmutagenesen	31
VII. Enzyme und Chemikalien	33
C. ERGEBNISSE	
I. Regulation der Expression des cgt-Strukturgens in K.pneumoniae M5a1	34
II. Isolierung von cgt-negativen Mutanten	39
III. Klonierung des cgt-Strukturgens aus K.pneumoniae M5a1	44
IV. Restriktionskartierung, Subklonierungsexperimente	49
V. Rückhybridisierungen	51
VI. Bestimmung der Nukleotidsequenz des cgt-Struktur- gens	52
VII. Expressionssignale	57
VIII. Expression des cgt-Strukturgens unter Kontrolle des tac-Promotors	61
1. Konstruktion von tac-cgt-Fusionsplasmiden	61
2. Expressionsexperimente	73
IX. Veränderung der Signalsequenz der CGT	82
X. Expression von cgt ohne Signalsequenz	89

1. Konstruktion eines tac-cgt-Expressionsplasmids ohne cgt-Signalsequenz	89
2. Expressionsexperimente	92
3. Experimente zur Regeneration der CGT-Aktivität	94

XI. Expression des cgt-Strukturgens in <i>B.subtilis</i>	98
--	----

D. DISKUSSION

I. Struktur und Expression des cgt-Gens von <i>K.pneumoniae</i> M5a1	104
1. Regulation der Expression des cgt-Strukturgens durch <i>K.pneumoniae</i> M5a1	104
2. Expression des cgt-Strukturgens durch <i>E.coli</i>	106
3. Sekretion von CGT	106
4. cgt in <i>K.pneumoniae</i> M5a1: Ein lateral trans- feriertes Gen?	109

II. Homologien in der Primärstruktur von CGT aus <i>K.pneumoniae</i> M5a1 zu anderen Stärke spalten- den Enzymen	111
1. Homologien zur CGT anderer Bakterienstämme	111
2. Homologien zu anderen Stärke spaltenden Enzymen	114

III. Expression des cgt-Strukturgens unter Kontrolle heterologer Promotoren	116
1. Expression unter Kontrolle des tac-Promotors	116
2. Expression in <i>B.subtilis</i> unter Kontrolle des spac I-Promotors	118

IV. Schlußbetrachtung und Zukunftsperspektiven	119
--	-----

E. ZUSAMMENFASSUNG

121

F. LITERATURVERZEICHNIS

123

Abkürzungen

A	Adenosin
Ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bla	Strukturgen für β -Lactamase
bp	Basenpaare
C	Cytidin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP	Katabolit-Aktivatorprotein
cat	Strukturgen für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CGT	Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase
cgt	Strukturgen für Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase
Cm	Chloramphenicol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
G	Guanosin
IPTG	Isopropyl-Thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pFp	para-Fluorphenylalanin
pheS	Strukturgen für Phenylalanyl-tRNS-Synthetase
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymidin
Tc	Tetrazyklin
tet	Strukturgen für Tc-Resistenz vermittelndes Protein
U	Uridin

Innerhalb einer DNS-Sequenz, die jeweils in 5'-3'-Orientierung dargestellt wird, wird jedes Nukleotid entsprechend seiner Base mit A, T, G oder C bezeichnet.

Aminosäuren werden entweder mit dem 3- oder 1-Buchstaben-Code dargestellt.

Weitere Abkürzungen sind aus den Legenden zu den Abbildungen zu entnehmen.

A. EINLEITUNG

Stärke ist eines der am weitesten verbreiteten natürlichen Polysaccharide. Naturgemäß gibt es daher Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Stärke als Kohlenstoffquelle zu verwerten.

Der Abbau von Stärke durch Mikroorganismen läuft im wesentlichen in 3 Phasen ab:

1. Hydrolyse durch extrazelluläre Enzyme:

Stärke kann als Gemisch hochmolekularer Polysaccharide (Amylose, Amylopektin) nicht in Zellen aufgenommen werden. Deshalb scheiden Stärke abbauende Organismen Enzyme aus, die diese Polysaccharide zu kleinen, durch die Zellmembran transportierbaren Molekülen abbauen. Dabei handelt es sich vor allem um Endo-Amylasen (α -Amylasen), Exo-Amylasen (β -Amylasen, Glucoamylasen) und entzweigende Enzyme (Pullulanasen, Isoamylasen) (Norman, 1979).

2. Transport der Hydrolyseprodukte in die Zelle:

Um als Kohlenstoffquelle verwendet werden zu können, müssen die bei der Stärkehydrolyse entstehenden Produkte (Glucose, Maltooligosaccharide) in die Zelle transportiert werden. Dies wird in der Regel über spezielle Transportsysteme (z.B. PEP: Glucose-Phosphotransferasesystem, Maltose-Permeasesystem) erreicht (Saier, 1985).

3. Intrazellulärer Abbau der Hydrolyseprodukte:

Können die in die Zelle transportierten Hydrolyseprodukte nicht direkt in den Primärstoffwechsel eingeschleust werden, müssen sie durch intrazelluläre Enzyme weiter abgebaut werden. Im Fall von Maltooligosacchariden geschieht dies z.B. durch Amylomaltasen und Maltodextrin-Phosphorylasen (Saier, 1985).

Stärke ist als nachwachsender Rohstoff in großen Mengen verfügbar. Sie wird daher als preiswertes Ausgangsmaterial (1,20 DM/kg) für industrielle Verfahren eingesetzt. Allein 1985 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 650.000 Tonnen Stärke produziert und verarbeitet (Kempf et al., 1985). Dies geschieht sowohl durch chemisch-technische (z.B. Säurehydrolyse) als auch durch biotechnologische Verfahren. Bei der biotechnologischen Stärkeverarbeitung kommen in erster Linie Enzyme, vor allem Amylasen, zur Anwendung (Norman, 1979; Kempf et al., 1985). Zur Erzeugung von speziellen Produkten aus dem Stärkeabbau können jedoch auch andere Enzyme mit bestimmten Produktspektren verwendet werden. Ein Beispiel dafür ist Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase [E.C.2.4.1.19, 1,4- α -D-glucan-4- α -glucan-4- α -(1,4- α -glucano-) transferase (cyclizing); Abk.: CGT].

Dieses Enzym ist zur Katalyse der folgenden beiden Reaktionen befähigt:

1. Abbau von Stärke zu Cyclodextrinen

Die durch CGT katalysierte Bildung von Cyclodextrinen läuft nach folgender Reaktionsgleichung ab:



(G = Glucoseeinheiten; n = Zahl der Glucoseeinheiten; CD = Cyclodextrine)

(Bender, 1977a; Szejtli, 1982; Horikoshi und Akiba, 1982)

Die bei der Stärkehydrolyse als Produkte entstehenden Cyclodextrine wurden erstmals 1891 von Villiers und 1903 von Scharinger beschrieben (Szejtli, 1982). Cyclodextrine sind ringförmige Oligosaccharide, die aus sechs oder mehr α -D-Glucoseeinheiten bestehen. Die Glucoseeinheiten sind über 1,4-Bindungen miteinander verknüpft (Szejtli, 1982). Abb. 1 zeigt die Struktur von Cyclodextrinen.

Abbildung 1:

Struktur von Cyclodextrinen (Horikoshi und Akiba, 1982)



Cyclohexa-
amylose

Cyclohepta-
amylose

Cycloocta-
amylose

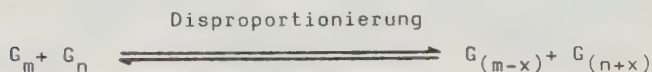
Zahl der Glucose- einheiten	6	7	8
Molekulargewicht	973	1135	1297
Hohlraumdurch- messer (Å)	5-6	7-8	9-10
Hohlraumlänge (Å)	7-8	7-8	7-8

Die Nomenklatur von Cyclodextrinen richtet sich nach der Zahl der Glucoseeinheiten (Abb. 1). Cyclodextrine mit mehr als 8 Glucoseeinheiten sind instabil und haben deshalb keine praktische Bedeutung (Szeijtli, 1982).

Die Zyklisierungsreaktion erfolgt, ähnlich wie in der Reaktion von β -Amylasen, in Form eines Exo-Angriffs, also vom nicht-reduzierenden Ende einer Amylose- bzw. Amylopektinkette her (Bender, 1981; Szejtli, 1982). Bei der entgegengesetzten Kupplungsreaktion erfolgt Ringspaltung und Transfer der entstehenden linearen Saccharide auf geeignete Akzeptoren (Glucose, Maltodextrine) (Bender, 1978).

2. Disproportionierungsreaktionen

Disproportionierungsreaktionen werden durch CGT in folgender Weise katalysiert:



(G = Glucoseeinheiten; n, m, x = Zahl der Glucoseeinheiten)
(Bender, 1977a; Szejtli, 1982; Horikoshi und Akiba, 1982)
Disproportionierungsreaktionen erfolgen im Gegensatz zur Zyklisierungsreaktion in Form eines Endo-Angriffs wie bei α -Amylasen (Bender, 1981).

Wie für die CGT von *Klebsiella pneumoniae* gezeigt wurde, laufen beide Reaktionen beim Stärkeabbau simultan ab (Bender, 1981). Dies ist zur Bildung von Cyclodextrinen aus der Stärkehydrolyse notwendig, da langkettige Amylosemoleküle schlechte Substrate für die Zyklisierungsreaktion darstellen (Bender 1980, Bender 1981). Durch Disproportionierungsreaktionen werden die Ketten auf eine Länge von weniger als 100 Glucoseeinheiten verkürzt, um dann als Substrate für Zyklisierungsreaktionen zu dienen (Bender, 1980).

Bedingt durch die ringförmige Struktur der Cyclodextrine entsteht ein zylinderförmiger, hydrophober Hohlraum, dessen Volumen von der Zahl der Glucoseeinheiten abhängt (Abb.1). In diese Hohlräume können zahlreiche Moleküle durch nicht-kovalente Wechselwirkungen

gebunden werden. Dazu tragen vor allem van der Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen, seltener Wasserstoffbrückenbindungen bei (Szejtli, 1982; Horikoshi und Akiba, 1982). Durch die Bildung von Einschlusskomplexen werden die physikalischen und chemischen Eigenschaften der eingelagerten Moleküle verändert. Diese Eigenschaft der Cyclodextrine kann für wirtschaftliche Zwecke nutzbar gemacht werden, insbesondere zur Stabilisierung flüchtiger bzw. instabiler Substanzen und zur Erhöhung der Löslichkeit bestimmter Moleküle (Szejtli, 1982; Horikoshi und Akiba, 1982). Horikoshi und Akiba (1982) beschreiben eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten für Cyclodextrine in der Kosmetik-, Lebensmittel-, Pharma-, Umwelt- und chemischen Industrie sowie in der Landwirtschaft (Tabelle 1).

Tabelle 1: Wirtschaftliche Anwendungsmöglichkeiten von Cyclodextrinen (Horikoshi und Akiba, 1982).

Anwendungsbereich	Eingeschlossene Moleküle und Endprodukte
Lebensmittel	
1. Emulgierung	Eiölse Mayonnaise, Gewürzöle, Schlagsahne etc.
2. Schaumkrafteerhöhung	Eiweiß (gefriergetrocknet), Backpulver etc.
3. Stabilisierung von Aromen und Gewürzen	Kaugummi-, Bisquitgeschmack, Gewürzpulver, Trockennudeln, Gewürzpaste etc.
4. Geschmacksmaskierung	Fleischpaste
Kosmetika	
1. Farbmaskierung	Fluorescein, Badesalze
2. Duftstabilisierung	Menthol
3. Stabilisierung	Chalcon, Dihydrochalcon (Zahnpasta)
Pharmazeutika	
1. Löslichkeitserhöhung	Prostaglandin, Phenobarbital, Chloramphenicol
2. Geschmacksmaskierung	Prostaglandin
3. Verfestigung zu Pulverform	Nitroglycerin, Clofibrat
4. Stabilisierung (UV, Hitze)	Prostaglandin, Vitamine
5. Senken der Reizwirkung	Kupfer- Alkanolamin- Komplex
Pestizide	
1. Stabilisierung (UV, Hitze)	Pyrethrine, Pyrethroide, Isoprenoide
2. Verfestigung zu Pulverform	DDVP (O,O-dimethylidichlorvinyl-phosphat) und andere
Pestizide	
Kunststoffe	
Stabilisierung von Farben und Aromen	Farben, Aromen
Andere	
	Klebstoffe

Daneben zeigen Cyclodextrine eine schwache Hydrolase-Aktivität (Horikoshi und Akiba, 1982; *Advances in Enzyme Technology*, 1984). Diese katalytische Eigenschaft kann durch Derivatisierung gesteigert werden (*Advances in Enzyme Technology*, 1984). Eine Anwendung derivatisierter Cyclodextrine als artifizielle Enzyme kann daher in Zukunft Bedeutung erlangen (*Advances in Enzyme Technology*, 1984).

Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase wurde erstmals 1939 durch French aus dem Kulturfiltrat von *Bacillus macerans* gereinigt (Szejtli, 1982). Seitdem wurden Enzyme mit gleicher Aktivität auch bei zahlreichen anderen Bakterienspezies beschrieben. Tabelle 2 zeigt eine Aufstellung von bisher bekannten CGT-Produzentenstämmen und die wichtigsten Eigenschaften ihrer Enzyme. Die Enzyme der verschiedenen CGT-produzierenden Mikroorganismen sind sowohl bezüglich ihrer Eigenschaften als auch, was die bei der Stärkehydrolyse gebildeten Cyclodextrine betrifft, sehr unterschiedlich.

Die Einteilung der CGT-produzierenden Mikroorganismen erfolgt nach den von ihnen bei der Stärkehydrolyse als Hauptprodukte gebildeten Cyclodextrinen in 3 Gruppen (Kobayashi et al., 1978; Kato und Horikoshi, 1986):

1. Organismen der Gruppe 1 bauen Stärke in erster Linie zu Cyclohexaamylose ab. In dieser Gruppe finden sich Stämme von *Bacillus macerans* und *Klebsiella pneumoniae*.
2. Organismen der Gruppe 2, die als Primärprodukt Cycloheptaamylose bilden, finden sich unter den Gattungen *Bacillus* und *Micrococcus*.
3. Die Gruppe 3 (Cyclooctaamylose als Hauptprodukt) wird bislang lediglich von einem Stamm der Species *Bacillus subtilis* repräsentiert.

Tabelle 2: Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase produzierende
Mikroorganismen

Organismus	Molekular- gewicht	Isoelektr. Punkt	pH- Optimum	Temperatur- Optimum (°C)	Referenz
Gruppe 1					
B. macerans IFO 3490	65.000	4.6	5.0-5.7	55	Kitahata et al. (1974), Kitahata und Okada (1974)
B. macerans IAM 1243	145.000 dimer		6.0	60	Schwimmer und Garibaldi (1952), Kobayashi et al. (1978), Takano et al. (1985), Takano et al. (1986)
B. macerans ATCC 8514	139.300		6.2		de Pinto und Campbell (1968)
B. macerans 17A	70.000				Hayashibara JP 228169 (1986)
K. pneumoniae M5a1	68.000 monomer	3.5	5.2-7.0	40	Bender (1977a), Binder (1984)
Gruppe 2					
B. megaterium (2 Enzyme)	66.000	6.07, 6.80	5.0-5.7	45-50	Kitahata et al. (1974) Kitahata und Okada (1974)
B. stearothermophilus FERM-P 2225	70.000		5.0-5.5		Hayashibara JP 228169 (1986)
B. circulans			5.2-6.1		Horikoshi und Akiba (1982)
alkalophile B.- species 17-1					Horikoshi et al. (1981) Horikoshi und Akiba (1982) Horikoshi et al. (1983)
alkalophile B.- species 38-2 (3 Enzyme)	85.000- 88.000		4.5-4.7, 7.0 8.0-9.0	45-50	Horikoshi et al. (1981) Horikoshi und Akiba (1982) Horikoshi et al. (1983)
alkalophile B.- species HA 3-3-2					Nomoto et al. (1984)
Mc. varians M-849	85.000	4.20	5.0-8.0	55-65	Sanraku-Ocean EP 80101818.5 (1983)
Mc. luteus B-645	85.000	4.20	5.0-8.0	55-65	Sanraku-Ocean EP 80101818.5 (1983)
Gruppe 3					
B. subtilis 313					Kato und Horikoshi (1986)

Die physiologische Bedeutung der Cyclodextrine für die CGT-Produzentenstämme liegt wahrscheinlich in ihrer schweren Abbaubarkeit durch andere Stärke spaltende Enzyme. Sie sind gegen den Abbau durch β -Amylasen resistent, da sie kein reduzierendes Ende besitzen (Szejtli, 1982). Für α -Amylasen stellen sie nicht bzw. nur langsam verwertbare Substrate dar (Szejtli, 1982; Freundlieb und Boos, 1986). Im Fall einiger Amylasen wird sogar eine Hemmung durch Cyclodextrine beschrieben (Thoma und Koshland, 1960; Szejtli, 1982).

Die Hydrolyse von Stärke zu Cyclodextrinen stellt daher selektive Substrate für die CGT-Produzentenstämme bereit. Die beim Stärkeabbau gebildeten Cyclodextrine werden offenbar als solche in die Zelle transportiert, dort linearisiert und weiter abgebaut (Bender, 1977a; Bender 1977b). Im Fall von *K.pneumoniae* M5a1 postuliert Bender (1977b) die Ringöffnung durch eine intrazelluläre Form der CGT und den weiteren Abbau der linearisierten Dextrine über Amylomaltase (Disproportionierung) und Maltodextrin-Phosphorylase (Phosphorolyse) zu Glucose und Glucose-1-phosphat.

Cyclodextrine werden in industriellem Maßstab ausschließlich über biotechnologische Verfahren hergestellt (Horikoshi und Akiba, 1982). Dazu werden CGT-produzierende Mikroorganismen unter entsprechenden Bedingungen kultiviert. Das Enzym wird anschließend aus dem Kulturfiltrat gewonnen und zur Erzeugung von Cyclodextrinen aus Stärke eingesetzt. Die gebildeten Cyclodextrine werden dann aus dem Ansatz gereinigt.

Durch entsprechende Wahl der Reaktionsbedingungen kann Einfluß auf die Zusammensetzung der Produkte genommen werden. So führt beispielsweise die Stärkehydrolyse durch CGT von *K.pneumoniae* M5a1 in erster Linie zur Bildung von Cyclohexaamylose, während Cyclohepta- und Cyclooctaamylose zunächst nur in sehr geringem Maß erzeugt werden. Längere Reaktionszeiten führen jedoch zu gesteigerten Bildungsraten der beiden letztgenannten Cyclodextrine (Bender 1980; Bender 1981). Dies wird dadurch bedingt, daß β - und γ -Cyclodextrin seltener in die Rückreaktion (Kupplungsreaktion) eingehen, bei der Cyclodextrine unter Ringspaltung auf

Akzeptoren übertragen werden (Bender, 1978). Nach Disproportionsierungsreaktionen erfolgen weitere Zyklisierungsreaktionen, die jeweils den Anteil von β - und γ -Cyclodextrin auf Kosten von Cyclohexaamylose erhöhen (Bender, 1980; Bender 1981).

Ein limitierender Faktor bei der Herstellung von Cyclodextrinen ist die Menge des verfügbaren Enzyms. Im Idealfall sollte das Kulturfiltrat aus der Anzucht des CGT-produzierenden Mikroorganismus ohne weitere Reinigung zur Erzeugung von Cyclodextrinen aus Stärke eingesetzt werden können.

Wegen der relativ niedrigen Ausbeute liegen die Kosten für die Produktion von Cyclodextrinen derzeit in einer Höhe, die eine industrielle Anwendung in breitem Maßstab wenig rentabel macht (Cyclohexaamylose: 100 DM/kg, Cycloheptaamylose: 30 DM/kg, Cyclooctaamylose: 2000 DM/kg; G. Schmid, pers. Mitteilung).

Wurde bisher eine Steigerung der Enzymsausbeute lediglich durch Optimierung der Fermentationsbedingungen, also durch Verbesserung rein technischer Parameter, erzielt (Bender, 1981), so richtet sich in letzter Zeit das Interesse in zunehmendem Maß auch auf gentechnologische Methoden, um die Enzymproduktion durch Bakterienstämme zu optimieren (Hayashibara, JP 228169, 1984; Takano et al., 1986; Kato und Horikoshi, 1986).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der CGT von *K.pneumoniae* M5a1 (Bender, 1977a).

Unter den in Tabelle 2 aufgeführten Mikroorganismen bildet dieser Stamm insofern eine Ausnahme, als er der bislang einzig bekannte gram-negative CGT-Produzent ist (Bender, 1981). Darüberhinaus ist die CGT dieses Stammes eines der wenigen Proteine, die in größeren Mengen von gram-negativen Bakterien ins Medium sezerniert werden.

Die Synthese des Enzyms durch *K.pneumoniae* M5a1 unterliegt einer strikten Regulation, an der vor allem Katabolitrepression und Induktion beteiligt sind (Bender, 1977a; Binder, 1984). Das Enzym wird nur gebildet, wenn der Stamm auf Stärke oder Cyclodextrinen als Kohlenstoffquellen wächst.

Bei Wachstum auf anderen Kohlenstoffquellen wird die Enzymsynthese unterdrückt bzw. nicht induziert. Da ein Einsatz von Cyclodextrinen als Induktoren aus Kostengründen nicht sinnvoll ist, können ausreichende Ausbeuten nur bei kontinuierlicher Fermentation erzielt werden, wenn Stärke als Kohlenstoffquelle limitierend zugegeben wird. Dabei können je nach Fermentationsbedingungen 25-50 mg CGT/l Kulturmedium produziert werden (G. Schmid, pers. Mitteilung). Weil Stärke aufgrund ihrer Eigenschaften (schlechte Löslichkeit, hohe Viskosität der Lösung) ein schwer zu handhabendes Substrat ist, entstehen bei der Fermentation erhebliche technische Probleme.

Darüberhinaus entstehen durch die Verwendung eines Enzyms einer potentiell pathogenen Art (*Klebsiella pneumoniae*) zur Produktion von Cyclodextrinen Schwierigkeiten bei der Zulassung für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, folgende Aufgaben zu lösen:

- 1.) Veränderung der Regulation der Enzymsynthese in einer Weise, die eine technisch problemlose Kultivierung des Organismus bei maximaler Expression ermöglicht.
- 2.) Produktion von CGT in möglichst großer Menge
- 3.) Expression des *cgt*-Strukturgens von *K.pneumoniae* M5a1 durch nicht-pathogene Mikroorganismen, um die mit Hilfe des Genprodukts gebildeten Cyclodextrine auch in der Pharma- bzw. Lebensmittelindustrie einsetzen zu können.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen, deren Genotyp und Herkunft sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Organismen

Organismus	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
------------	---------	------------------------

Escherichia coli K12

RR 28	hsdS20, recA1, supE44, lacY1 ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, leuB6, proA2, thi-1, rpsL20, pheS12, R ⁻ , F ⁻	Hennecke et al. (1982)
HB 101	hsdS20, recA1, supE44, lacY1, ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, leuB6, proA2, thi-1, rpsL20, R ⁻ , F ⁻	Boyer und Roulland-Dussoix (1969)

Organismus	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
------------	---------	------------------------

DS 410	ara-13, gal-6, xyl-7, mtl-2, thi-1, minA1, minB2, tonA2, azi-8, rpsL135, F ⁻	Dougan und Sherratt (1977)
MM 294	hsdR17, supE44, endA1, thi-1, R ⁻ , F ⁻	Meselson und Yuan (1968)
JM 101	supE, Δ (lac-proAB), thi, F', traD36, proAB, lacI ^q , Z Δ M15	Yanish-Perron et al. (1985)
JM 105	hadR4, endA, sbcB15, Δ (lac-pro AB) thi, rpsL, F', traD36, pro AB, lacI ^q , Z Δ M15	Yanish-Perron et al. (1985)
BMH 71/18 mut S	supE, Δ (lac-proAB), thi-1, mutS::Tn10, F', traD36, proAB, lacI ^q , Z Δ M15	Kramer et al. (1984)

Organismus	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
------------	---------	------------------------

Klebsiella pneumoniae

M5a1	Wildtyp	Bender (1977a)
RC 10	wie M5a1, aber Δcgt	diese Arbeit
UN 1290	recA56, hisD4226, srl300::Tn10	Mac Neil et al. (1978)
RC 23	wie UN 1290, aber cgt^-	diese Arbeit
KAY 2026	sor(T^S), arg, gua, fla, $P1^S$, F^-	Sprenger und Lengeler (1984)

Bacillus subtilis

1A297	amyE, aspI, trpC2	BSGC ^a
-------	----------------------	-------------------

^aBacillus Genetic Stock Center

Die für diese Arbeit verwendeten Vektorplasmide sowie die mit ihrer Hilfe erzeugten rekombinanten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp	Kurzbeschreibung bzw. Referenz
Vektorplasmide			
pBR 332	4.36	bla, tet	Bolivar et al. (1977)
pBR 328	4.90	bla, cat, tet	Covarrubias et al. (1981)
pHE 3	4.5	cat, pheS	Hennecke et al. (1982)
pJF 118u	5.27	bla, tac lacI ^q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	P. Heinrich (pers. Mitteilung)
pJF 118ut	6.38	bla, tet, tac, lacI ^q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	1.114 kb Nru I-Frag- ment aus pBR 328 in pJF 118u x Nru I (diese Arbeit)
pSI 1	5.30	cat, spaci, lacI	Yansura und Henner (1984)

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp	Kurzbeschreibung bzw. Referenz
---------	---------------	---------	-----------------------------------

rekombinante Plasmide

pCM 100	9.90	cat, cgt	5.4 kb Pst I-Fragment aus Gesamt-DNS von K.pneumoniae M5a1 in pHE 3 x Pst I (diese Arbeit)
pCM 101	7.70	cat, cgt	2.2 kb Hind III-Frag- ment von pCM 100 dele- tiert (diese Arbeit)
pCM 102	7.05	cat, cgt	0.65 kb Hpa I-Fragment von pCM 101 deletiert (diese Arbeit)
pCM 103	5.4	bla, cgt	2.9 kb Hpa I/Eco RV- Fragment aus pCM 102 in pBR x 322 Eco RV/ Pvu II (diese Arbeit)
pCM 109	7.36	tet, cgt	3.75 kb Eco RI/Pst I- Fragment von pCM 100 in pBR 322 x Eco RI/ Pst I (diese Arbeit)
pCM 111	5.70	cat, cgt	2.0 kb Hind III-Frag- ment von pCM 101 dele- tiert (diese Arbeit)

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp	Kurzbeschreibung bzw. Referenz
---------	---------------	---------	-----------------------------------

pCM 702	8.46	bla, tet, tac-cgt, lacI ^Q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	tac-cgt-Translations- fusion; 2068 bp Mae I- Fragment von pCM 100 mit Eco RI-Linker in pJF 118ut x Eco RI (diese Arbeit)
pCM 700	8.46	bla, tet, tac-cgt, lacI ^Q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	tac-cgt-Translations- fusion; 2068 bp Mae I- Fragment von pCM 100 nach Auffüllreaktion in pJF 118ut x Eco RI (diese Arbeit)
pCM 704	8.46	bla, tet, tac-cgt, lacI ^Q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	tac-cgt-Translations- fusion; 2068 bp Mae I- Fragment von pCM 100 nach Abbaureaktion in pJF 118ut x Eco RI (diese Arbeit)
pCM 703	8.46	bla, tet, tac-cgt, lacI ^Q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	tac-cgt-Translations- fusion; 2068 bp Mae I- Fragment von pCM 100 nach Abbaureaktion in pJF 118ut x Eco RI (diese Arbeit)

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp	Kurbeschreibung bzw. Referenz
pCM 803	10.23	bla, tet, tac-cgt, lacI ^q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	tac-cgt-Transkriptions- fusion; 3.85 kb Ssp I- Fragment von pCM 100 in pJF 118ut x Sma I (diese Arbeit)
pCM 2000	8.46	bla, tet, tac-cgt, lacI ^q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	wie pCM 702; aber Signal- sequenz mit 2 Basenaus- tauschen durch Oligo- nukleotidmutagenese (diese Arbeit)
pCM 1011	8.37	bla, tet, tac-cgt, (ohne Signal- sequenz) lacI ^q , rrnB, T ₁ , T ₂ , 5s	tac-cgt-Translations- fusion, Signalsequenz durch Oligonukleotid- Mutagenase deletiert (diese Arbeit)
pES 1	7.38	cat, spacI-cgt, lacI	spacI-cgt-Translations- fusion ; 2078 bp Eco RI-Fragment von pCM 702 nach Auffüll- reaktion in pSI 1 x XbaI (diese Arbeit)

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp	Kurzb Beschreibung bzw. Referenz
---------	---------------	---------	-------------------------------------

pES 2	7.37	cat, spacI-cgt, lacI	spacI-cgt-Translations- fusion; 2078 bp Eco RI-Fragment von pCM 702 nach Abbau- reaktion in pSI 1 x XbaI (diese Arbeit)
-------	------	-------------------------	--

Darüberhinaus wurden die M13-Bakteriophagen mp 9 und mp 19 als Vektoren verwendet (Yanisch-Perron et al., 1985).

II. Kulturmedien

1. Vollmedium

Als Standard-Vollmedium wurde Luria-Bertani-Broth (LB) verwendet:
1 % Trypton; 0.5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl (Miller, 1972).

2. Minimalmedien

Als Minimalmedien wurden verwendet:

a. Werkmann-Minimalmedium (Fraenkel und Neidhardt, 1961):

50 mM Na_2HPO_4 ; 100 mM KH_2PO_4 ; 0.1 mM CaCl_2 ; 1 mM
 MgSO_4 ; 12 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

b. Bender-Minimalmedium (Bender, 1977a):

11 mM KH_2PO_4 ; 56 mM NH_4Cl ; 6.7 mM KCl; 0.1 mM FeSO_4
 $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 1.7 mM Natriumcitrat; 2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 1.4 mM
 $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$.

Kohlenstoffquellen (Glucose, Stärke, etc.) wurden zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben.

Für die Kultivierung auxotropher Stämme wurden den Minimalmedien Aminosäuren in einer Konzentration von 40 µg/ml, Nukleotide in einer Konzentration von 20 µg/ml und Vitamine in einer Konzentration von 5 µg/ml zugesetzt.

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1.5 % Agar.

Selektivmedien wurden mit Antibiotika in folgenden Konzentrationen versetzt:

Ampicillin: 200 µg/ml;

Tetrazyklin: 20 µg/ml für Plasmid- bzw. 10 µg/ml für chromosomal kodierte Resistenzen;

Chloramphenicol: 20 µg/ml; zur Selektion von pSI-1-Abkömmlingen wurde die Konzentration auf 10 µg/ml reduziert;

para-Fluor-Phenylalanin: 200 µg/ml.

Zur Isolierung Stärke spaltender Stämme wurden LB-Platten verwendet, die 0.5 % Amylopektin-Azur (Sigma) enthielten.

3. DM 3-Regenerationsmedium

Zur Regeneration von *B. subtilis* Protoplasten wurde DM 3-Regenerationsmedium (Chang und Cohen, 1979; modifiziert nach Corfield et al., 1984) in folgender Zusammensetzung verwendet: 0.5 % Natriumsuccinat; pH 7.3; 0.02 M K_2HPO_4 ; 0.01 M KH_2PO_4 ; 0.02 M $MgCl_2$; 0.5 % Casaminosäuren; 0.5 % Hefeextrakt; 0.01 % Rinderserumalbumin; 0.5 % Glucose; 1.0 % Stärke; 0.8 % Agar. Zur gleichzeitigen Selektion von Cm-resistenten Klonen wurde dem Medium Chloramphenicol (5 µg/ml) zugegeben.

III. Anzuchtbedingungen

Anzuchten im Maßstab bis 500 ml erfolgten in Erlenmeyerkolben bei 30°C bzw. 37°C in Wasserbadschüttlern (New Brunswick G 76). Anzuchten im Großmaßstab wurden in einem 10 l-Fermenter (Braun-Melsungen, Biostat) durchgeführt. Das Wachstum der Kulturen wurde, soweit nicht anders erwähnt, durch Messung der optischen Dichte bei 420 nm in einem Spektralphotometer (Hitachi, 100-20) verfolgt.

Für Induktionsexperimente mit tac- bzw. spac-I-Promotoren wurden die Organismen entweder in Medium mit 1 % Lactose über Nacht angezogen oder bis zu einer optischen Dichte bei 500 nm von 0.5 kultiviert, anschließend durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-Thiogalactosid; Boehringer, Mannheim) zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt und 4-5 h lang weiterinkubiert.

IV. Enzymologische und proteinchemische Methoden

1. Bestimmung der Aktivität von Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase

Die Bestimmung der CGT-Aktivität erfolgte nach einer von Dr. O. Huber (Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, München, persönliche Mitteilung) ausgearbeiteten Methode:

200 µl 10 %ige Lösung von Noredux N 150 B und 200 µl enzymhaltige Probenlösung wurden getrennt bei 40°C vorinkubiert, anschließend gemischt und 10 min bei 40°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 µl Methanol unterbrochen. Nicht umgesetztes Substrat wurde nach 10-minütiger Inkubation in Eis durch Zentrifugation (10 min in der Eppendorfzentrifuge) abgetrennt.

Die quantitative Bestimmung der während der Reaktion gebildeten Cyclodextrine wurde freundlicherweise von Dr. G. Schmid (Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, München) über HPLC (high performance liquid chromatography) durchgeführt.

1 Einheit wurde als die Enzymmenge definiert, die pro min 1 µmol Cyclohexaamylose aus Noredux N 150 B bildet.

2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Elektrophoresen zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen bzw. Zellextrakten wurden in SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970) durchgeführt. Das zu untersuchende Material wurde vorher mit Probenpuffer (Laemmli und Favre, 1973) gemischt und 10 min bei 95°C denaturiert.

Zum Anfärben der Proteinbanden wurde 0.2 % Coomassie-Blau bzw. Amido-Schwarz in Methanol/Essigsäure/Wasser (3:1:6) verwendet.

3. Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz

Die Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz der CGT erfolgte mit Hilfe des sog. Chang-Abbaus (Chang et al., 1979) in der von Wittmann-Liebold und Kimura (1984) beschriebenen Weise. Als Ausgangsmaterial dienten 350 µg (= 5 nmol) über Affinitätschromatographie gereinigte CGT.

Die während der einzelnen Sequenzierungsschritte abgespaltenen und zum Thiazolinon derivatisierten Aminosäuren wurden über zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Mikropolyamidplatten (Schleicher & Schüll, F 1700) aufgetrennt, durch Bedampfen mit rauchender Salzsäure als rötliche Flecken sichtbar gemacht und entsprechend ihrem Laufverhalten identifiziert.

V. Immunologische Methoden

1. Präparation von anti-CGT-Antikörpern

a. Immunisierung von Kaninchen

Kaninchen wurden mit gereinigter CGT immunisiert. Dazu wurde den Tieren jeweils 1 mg CGT als Suspension mit komplettem Freund'schen Adjuvans im Verhältnis 1:1 (v/v) subcutan injiziert. Weitere Injektionen erfolgten 3 bzw. 7 Wochen nach der Erstimmunisierung mit jeweils 0.5 mg CGT als Suspension mit incompletten Freund'schen Adjuvans. Jeweils 8 Tage nach diesen Boosterinjektionen wurden aus den Ohrvenen der Kaninchen jeweils ca. 40 ml Blut entnommen.

b. Präparation von Rohserum und Isolierung von Immunglobulin G

Aus dem den Kaninchen entnommenen Blut wurde Rohserum in der von Piepersberg et al. (1975) beschriebenen Weise isoliert. Die Immunglobulin G-Fraktion wurde über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie gewonnen (Garvey et al. 1977). Die Chromatographie erfolgte mittels DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman). Zur Elution wurde PBS (20 mM NaPO_4 pH 7.0; 0.15 M NaCl) verwendet. Die IgG-Fraktion konnte im Ausschlußvolumen gewonnen werden.

2. Immunoblotting

Für Immunoblotting-Analysen wurde die Methode von Howe und Hershey (1981) mit den von Schmid und Böck (1984) beschriebenen Modifikationen verwendet.

Proteine wurden nach Auftrennung in 12.5 % SDS-Polyacrylamid-Gelen (Laemmli, 1970) in einer Blotkammer (Bio Rad) elektro-pheretisch (3 h, 50 V) auf Nitrozellulosefilter übertragen. Als Puffer wurde 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol; 0.1 % SDS; pH 8.5 verwendet. Nach Absättigung potentieller Bindungsstellen mit 3 % Rinderserumalbumin in Puffer A (0.2 % SDS; 0.5 % Triton X 100 , 0.9 % NaCl; 10 mM Tris/Cl, pH 7.4) wurden die Filter über Nacht mit anti-CGT-IgG-Fraktion (0.1 mg/ml in Puffer A mit 0.5 % Rinderserumalbumin) bei Raumtemperatur inkubiert. Kreuzreagierende Antikörper wurden mit Hilfe von ^{125}J -markiertem Protein A (aus Staphylococcus aureus; 9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$; NEN) detektiert.

VI. Genetische Methoden

1. UV-Mutagenese

UV-Mutagenesen wurden nach Miller (1972) mit einer UV-Lampe (Wellenlänge: 254 nm, Intensität: $350 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) bei Abtötungs-raten von 95-99 % durchgeführt. Mutagenisierte Kulturen wurden zunächst in permissivem Medium kultiviert und anschließend mehr-mals in nicht permissivem Medium mit D-Cycloserin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegenselektiert (Miller, 1972).

2. Isolierung von DNS

a. Isolierung von Gesamt-DNS

Gesamt-DNS aus Bakterien wurde nach der Methode von Saito und Miura (1963) oder in der von Marmur (1961) beschriebenen Weise isoliert.

b. Isolierung von Plasmid-DNS

Zur Isolierung von Plasmid-DNS in präparativem Maßstab wurden Plasmid-enhaltende Stämme in LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum bis zu einer O.D.₄₂₀ von 0.7-1 angezogen und nach Zugabe von 150 µg/ml Chloramphenicol bzw. Spectinomycin über Nacht zur Amplifikation der Plasmide weiterinkubiert. Anschließend wurde Plasmid-DNS nach Clewell und Helinski (1972) bzw. Ish-Horowicz und Burke (1981) isoliert. Die Plasmide wurden durch zweimalige 24-stündige Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Dichtegradienten gereinigt.

Plasmidschnellpräparationen wurden nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) bzw. modifiziert nach Chen und Seeburg (1985) durchgeführt.

Für Plasmidschnellpräparationen aus *B. subtilis* wurde die Lysozymkonzentration verdoppelt.

c. Isolierung von DNS des Phagen M13

Einzelsträngige DNS von rekombinanten M13-Phagen wurde nach Messing (1983) isoliert. Doppelsträngige DNS (replikative Form) wurde aus *E.coli*-Zellen in der gleichen Weise wie bei Plasmidschnellpräparationen (Birnboim und Doly, 1979) gewonnen.

3. Isolierung von RNS

RNS wurde aus *E.coli* bzw. *K.pneumoniae*-Stämmen in der von Beauclerk et al. (1985) beschriebenen Weise isoliert.

4. Methoden zur in vitro Rekombination von DNS

a. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Spaltung von doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen wurde gemäß den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Zur Durchführung von Doppelspaltungen wurde die DNS entweder unter Einsatz eines Gemisches der entsprechenden Puffer mit beiden Enzymen gleichzeitig inkubiert oder nach Inkubation mit einer Restriktionsendonuklease, anschließender Phenolextraktion und Äthanolpräzipitation mit einem zweiten Enzym nachgespalten.

b. Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten in Agarosegelen

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele verwendet. Die Konzentration an Agarose wurde je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0.6 und 1.6 % gewählt. DNS wurde in einer 1:1 (v/v) Mischung mit Auftragspuffer (Schaffner, 1975) in die Auftragstaschen pipettiert und bei 60-100 V aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer kam TBE-Puffer (0.089 M Tris; 0.089 M Borsäure; 0.002 M EDTA; pH 8.0; Peacock und Dingmann, 1969) zur Anwendung. Zur "Anfärbung" der DNS-Fragmente wurde den Gelen Äthidumbromid in einer Konzentration von 1 µg/ml beigelegt (Sharp et al., 1973). An DNS gebundenes Äthidumbromid wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht. Die Größe von DNS-Fragmenten wurde durch Vergleich der Laufstrecken mit Marker-DNS (λ-DNS, gespalten mit Eco RI und Hind III) bestimmt.

c. Isolierung von DNS aus Agarosegelen

DNS-Fragmente wurden aus Agarosegelen nach der von Benson (1984) beschriebenen Methode isoliert.

Eine Alternative stellte die Verwendung von DEAE-Membranen (Schleicher & Schüll, NA 45; Peter Heinrich, persönliche Mitteilung) dar. Dazu wurde das Gel unterhalb der zu isolierenden Bande aufgeschnitten und ein entsprechend vorbehandeltes DEAE-Membranstück (10 min Vorinkubierung in 10 mM EDTA pH 7.6, anschl. Waschen in 0.5 M NaOH) eingeführt. Durch weitere Elektrophorese wurde die DNS an die Membran gebunden. Die DNS wurde mittels Hochsalzpuffer (1M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris/Cl, pH 8.0; 30 min bei 60°C) von der Membran gelöst und mit Äthanol präzipitiert.

Darüberhinaus konnten DNS-Fragmente nach Auftrennung in sog. "low gelling temperature agarose" (Sigma, Typ VII) durch Ausschmelzen gewonnen werden. Dazu wurde die Methode von Weislander (1979) modifiziert verwendet: Das Gelstück wurde mit einem Volumenteil Wasser versetzt. Nach Zugabe von 1/10 Volumenteil 4 M Lithiumchlorid wurde der Ansatz 10 min lang bei 68°C inkubiert, anschließend mit dem gleichen Volumen Phenol gemischt und auf -70°C abgekühlt. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen, mit Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol reextrahiert und anschließend mit Äthanol präzipitiert.

d. Behandlung von DNS-Fragmenten zur Schaffung glatter Enden

5'-überhängende Enden wurden mit Hilfe des großen Fragments (sog. Klenow-Fragment) der DNS-Polymerase I von E.coli mit Desoxynukleotid-Triphosphaten aufgefüllt (Maniatis et al., 1982). Glatte Enden konnten alternativ dazu auch durch Behandlung des Fragments mit Nuklease S1 erzeugt werden (Maniatis et al., 1982).

e. Anheften von synthetischen Linkermolekülen

Synthetische Linkermoleküle wurden nach vorhergehender Phosphorylierung am 5'-Ende mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase durch

Behandlung mit T4-DNS-Ligase an DNS-Fragmente mit glatten Enden angebunden (Maniatis et al., 1982). Anschließend wurden kohäsive Enden durch Spaltung mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease erzeugt. Nach Abtrennung der überschüssigen Linkermoleküle durch Agarose-Gelelektrophorese wurde das Fragment aus dem Gel extrahiert und mit einem entsprechend präparierten Vektorfragment ligiert.

f. Ligation von DNS-Fragmenten

Ligationen von DNS-Fragmenten für Klonierungsansätze wurden mit T4-DNS-Ligase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden DNS-Fragmente mit kohäsiven bzw. glatten Enden in äquimolaren Mengen eingesetzt, während für Klonierungen von Gesamt-DNS-Fragmenten die Konzentration von Vektor-DNS nach Williams und Blattner (1980) berechnet wurde. Im Falle von Vektorfragmenten mit 5'-überhängenden Enden wurden die endständigen Phosphatgruppen mit alkalischer Kälberdarm-Phosphatase abgespalten, um ein Religieren der Vektorfragmente zu verhindern (Maniatis et al., 1982).

5. Transformation von Bakterienzellen

Transformation von E.coli- bzw. K.pneumoniae-Zellen mit Plasmid-DNS erfolgte nach Cohen et al. (1972). Zellen von B.subtilis wurden nach der Methode von Chang und Cohen (1979) mit den von Corfield et al. (1984) beschriebenen Modifikationen transformiert.

6. Transfektion von E.coli-Zellen

Transfektion von E.coli-Zellen mit rekombinanter DNS des Bakteriophagen M13 wurde nach Messing (1983) durchgeführt.

7. Markierung von DNS-Fragmenten mit ^{32}P Phosphat

a) "Nick-translation"

Markierung von DNS-Fragmenten, die für Hybridisierungs-experimente verwendet werden sollten, erfolgte mittels sog. "nick-translation" durch E.coli DNS-Polymerase I (Holoenzym) mit einem ($\alpha^{32}\text{P}$)-dNTP in Anwesenheit von unmarkierten dNTP (Maniatis et al., 1982). Nicht gebundene Nukleotide wurden durch Säulen-Chromatographie an Sephadex G 25 (Whatman) abgetrennt.

b) Endmarkierung von DNS-Fragmenten mit 5'-überstehenden Enden

Die Markierung der DNS-Fragmente an den 3'-Enden erfolgte durch Auffüllreaktion mit einem ($\alpha^{32}\text{P}$) dNTP und unmarkierten dNTP (siehe 4.d.). 5'-Enden wurden nach vorhergehender Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe durch alkalische Kälberdarm-Phosphatase (Maniatis et al., 1982) mittels T4-Polynukleotid-Kinase mit ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP markiert (Maxam und Gilbert, 1980).

8. Hybridisierungsexperimente

a. DNS-DNS Hybridisierungen

Für DNS-DNS Hybridisierungen wurden Restriktionsfragmente von Gesamt- bzw. Plasmid-DNS nach Auftrennung in Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schüll, BA 85) übertragen (Southern, 1975). Hybridisierungen mit markierten DNS-Fragmenten erfolgte durch Inkubation bei 65°C in $6 \times \text{SSPE}$ (0.9 M NaCl ; $0.06 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$; 6 mM EDTA ; $\text{pH } 7.4$) mit 0.7% Magermilchpulver (Johnson et al., 1984). Die Filter wurden in $4 \times \text{SSPE}$ (0.6 M NaCl ; 0.04 M EDTA ; $0.04 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$; $\text{pH } 7.4$) mit 0.25% Magermilchpulver und 0.1% SDS gewaschen und mit einem Röntgenfilm exponiert.

b. DNS-RNS Hybridisierungen

Für DNS-RNS Hybridisierungen wurde Gesamt-RNS unter denaturierenden Bedingungen (6.08 % Formaldehyd im Gel) in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt (Lehrach et al., 1977). Als Elektrophoresepuffer wurde 20 mM NaPO_4 ; pH 6.5 mit 6.08 % Formaldehyd verwendet. Anschließend wurde die RNS auf Gene-Screen Filter (NEN) übertragen (Southern, 1975). Hybridisierungen mit markierten DNS-Fragmenten wurden bei 37°C in 6 x SSPE mit 0.7 % Magermilchpulver und 50 % Formamid durchgeführt (Johnson et al., 1984). Waschungen erfolgten nacheinander in 2 x bzw. 0.1 x SSPE mit 0.25 % Magermilchpulver und 0.1 % SDS.

9. DNS-Sequenzierung

a. DNS-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1980)

Um DNS mit Hilfe der chemischen Spaltung zu sequenzieren, wurde Plasmid-DNS mit einer Restriktionsendonuklease gespalten. Nach 3'- oder 5'-Markierungen der Enden erfolgte Spaltung durch eine weitere Restriktionsendonuklease. Das zu sequenzierende Fragment wurde nach Auftrennung durch Elektrophorese in "low gelling temperature" Agarose aus dem Gel isoliert und für die Sequenzreaktionen eingesetzt. Die basenspezifischen Reaktionen erfolgten nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) mit Ausnahme der A+G Reaktion, die nach Gray et al. (1978) durchgeführt wurde.

b. DNS-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977)

Um DNS-Sequenzierungen nach der Kettenabbruchmethode durchzuführen, wurde das zu sequenzierende DNS-Fragment mit einem entsprechend präparierten M13-Vektor ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden E.coli-Zellen transfiziert und aus den Klonen einzelsträngige DNS isoliert. Nach Hybridisierung mit einem einzelsträngigen "Primer-Molekül" wurden die Sequenzreaktionen in der von Messing (1983) beschriebenen Weise durchgeführt.

c. Elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Fragmente

Die durch die Sequenzierungsreaktionen entstandenen Fragmente wurden durch Elektrophorese in 6 %, 8 % und 20 %igen Polyacrylamidgelen, die 7 M Harnstoff enthielten, aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert.

d. Computeranalyse

Zur Auswertung der erhaltenen DNS-Einzelsequenzen wurde das von Larson und Messing (1985) entwickelte Programm "sequence analysis", Version 3.0, verwendet.

10. Bestimmung der Transkriptionsstartstelle mit Nuklease S1

Die Bestimmung der Initiationsstelle der Transkription wurde in der von Wich et al. (1986) beschriebenen Weise durchgeführt. Dazu wurden 50 µg Gesamt-RNS mit 1 µg des entsprechenden 5'-end-markierten DNS-Fragments bei 85°C denaturiert und anschließend 3 h lang hybridisiert (Weaver und Weissmann, 1979). Die Hybridisierung wurde in 40 mM Pipes; 80 % Formamid; 0.4 M NaCl und 1 mM EDTA; pH 6.4 (Schenk et al., 1975) durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur wurde nach Casey und Davidson (1977) errechnet. Der Ansatz wurde nach Hybridisierung durch Zugabe des 10-fachen Volumens Nuklease S1-Puffer (5 mM Natriumformiat 280 mM NaCl; 4.5 mM ZnSO₄; pH 4.6 mit 20 µg/ml einzelsträngiger Träger-DNS) verdünnt und mit Nuklease S1 zu einer Endkonzentration von 1000 Einheiten/ml versetzt (Berk und Sharp, 1977). Nach 45-minütiger Inkubation bei 30°C wurden die Reaktionsprodukte mit Äthanol präzipitiert und in einem 6 % Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetrennt. Als Größenstandard diente ein Sequenzansatz des entsprechenden 5'-end-markierten DNS-Fragments.

11. Oligonukleotid-Mutagenesen

Die verwendeten Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Merz (Genzentrum München) zur Verfügung gestellt.

a. Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden über Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt (Applied Biosystems, 1984). Dazu wurden 10 O.D.₂₆₀ der Oligonukleotide lyophilisiert und in Applikationspuffer (Formamid-dye; Maxam und Gilbert, 1980) denaturiert.

Die Elektrophorese erfolgte in 16 %igen Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff. Die Oligonukleotid-Banden wurden auf einer Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Macherey & Nagel, Polygram sil G/UV₂₅₄) unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Nach mechanischer Zerkleinerung des entsprechenden Gelstückes wurde der Ansatz mit Wasser auf ein Volumen von 500 µl gebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen des Gelfragments wurde die wäßrige Phase mit nButanol eingeeengt und die Oligonukleotide durch Äthanolpräzipitation gewonnen.

b. Oligonukleotidmutagenesen

Oligonukleotid-Mutagenesen wurden entweder mit Hilfe der sog. Reparatur-Synthese-Methode nach Yelverton et al. (1983) oder nach der sog. "gapped duplex"-Methode von Cramer et al. (1984) durchgeführt.

Im ersten Fall wurden 500 pmol des entsprechenden Oligonukleotids zusammen mit 3-5 µg des zu mutierenden DNS-Fragments durch Äthanol präzipitiert. Der Niederschlag wurde in 50 µl Wasser aufgenommen, 10 min lang durch Inkubation bei 100°C denaturiert, anschließend in flüssigem Stickstoff abgekühlt und auf Eis überführt. Der Ansatz wurde nach Zugabe von dNTP auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht und mit 10 Einheiten DNS-Polymerase in Kombination mit dem Protein 32 des Bakteriophagen T4

(10 µg) 4 h lang bei Raumtemperatur inkubiert (Craik et al., 1985). Nach Phenolextraktion und Äthanol-fällung wurden die Reaktionsprodukte mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten. Die entstandenen Fragmente wurden durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt und das gewünschte Fragment nach Extraktion aus dem Gel mit Vektor-DNS ligiert.

Um eine Oligonukleotid-Mutagenese nach der sog. "gapped duplex-" Methode durchzuführen, wurde das zu mutierende DNS-Fragment mit entsprechend vorbehandelter doppelsträngiger DNS des M13-Phagen mp 9, der in 2 Genen amber-Mutationen trägt und infolgedessen nur in Suppressor-Stämmen (supE) propagierbar ist (Messing et al., 1981), ligiert. Mit der ligierten DNS wurden Zellen des E.coli-Stammes JM 101 (supE44) transfiziert. Aus den daraus erhaltenen Klonen wurde einzelsträngige DNS isoliert (der sog. +-Strang). Anschließend wurde doppelsträngige DNS des Bakteriophagen M13 mp 19, der keine Mutationen trägt, mit den für die Klonierung des mutierenden DNS-Fragments verwendeten Restriktionsendonukleasen gespalten. Durch in vitro DNS/DNS-Hybridisierung wurde ein sog. "gapped duplex" hergestellt, anschließend das synthetische Oligonukleotid anhybridisiert und die verbleibenden Lücken durch gleichzeitige Behandlung mit DNS-Polymerase und Protein 32 des Bakteriophagen T4 sowie E.coli DNS-Ligase aufgefüllt. Durch Transfektion von Zellen eines "mismatch-repair"-defizienten E.coli-Stamm (BMH 71/18 mutS) mit dem Ansatz wurde eine Mischpopulation von Bakteriophagen-Nachkommen erzeugt. Durch Infektion eines Suppressor-freien E.coli-Stammes (JM 105) mit den gewonnenen Bakteriophagen wurden Nachkommen des nicht-mutierten Strangs (+-Strang des Phagen M13 mp9) eliminiert. Aus den auf diese Weise isolierten Klonen wurde einzelsträngige DNS isoliert und durch Ermittlung von Teilsequenzen (sog. "T-tracking") auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation untersucht.

VII. Enzyme und Chemikalien

Enzyme für in vitro Experimente an DNS wurden von Boehringer (Mannheim), Pharmacia P-L Biochemicals (Uppsala) und New England Biolabs bezogen.

Radioisotope wurden von New England Nuclear (Dreieich) oder Amersham-Buchler (Braunschweig) geliefert.

Über Affinitätschromatographie an Cyclohexaamylose aus Kultur-Überstand von *K.pneumoniae* M5a1 gereinigte CGT wurde vom Consortium für elektrochemische Industrie, GmbH, München, zur Verfügung gestellt (G. Schmid, persönliche Mitteilung); von der gleichen Stelle wurde durch Säurebehandlung teilhydrolysierte Stärke (Noredux N 150 B) erhalten.

Phenol wurde durch Destillation gereinigt, mit 0.1 % 8-Hydroxy-chinolin versetzt und mit 0.1 M Tris/Cl; pH 8.0 und 0.2 % β -Mercaptoäthanol gesättigt (Maniatis et al., 1982). Phenol/Chloroform wurde durch Mischung gleicher Volumina Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) erzeugt.

Chemikalien für die Proteinsequenzierung wurden ebenfalls durch Destillation gereinigt.

Antibiotika wurden von Boehringer (Mannheim), Sigma (München) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

C. ERGEBNISSE

I. Regulation der Expression des cgt-Strukturgens in K.pneumoniae M5a1

Wie bereits aus früheren Arbeiten bekannt war, unterliegt die Synthese von CGT in K.pneumoniae M5a1 einer strikten Regulation (Bender 1977 a; Binder, 1984). Beteiligte Regelmechanismen sind offenbar hauptsächlich Katabolitrepression und Induktion (Binder, 1984).

Um nähere Informationen, insbesondere über die Identität der Induktoren, zu erhalten, wurde die Synthese des Enzyms durch K.pneumoniae M5a1 unter verschiedenen Anzuchtbedingungen untersucht. Dazu wurde der Stamm in Minimalmedium (Bender, 1977a) unter verschiedenen Bedingungen bis zur Mitte der logarithmischen Phase kultiviert. Die Kultur (Zellen plus Überstand) wurde gegen 3 mM Tris/Cl; pH 7.2; 5 mM CaCl_2 dialysiert, lyophilisiert, anschließend in Applikationspuffer (1/10 des Ausgangsvolumens) (Laemmli und Favre, 1973) aufgenommen. 40 μl davon wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einem Immunoblotting-Experiment unterzogen.

Zunächst wurde die Enzymsynthese bei Wachstum auf verschiedenen linearen und zyklischen Dextrinen sowie Stärke untersucht.

Getestet wurden Glucose, Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose, Maltoheptaose, lösliche Stärke (p.A., Merck), Noredox N 150 B (partiell säurehydrolysierte Stärke) sowie Cyclohexa- und Cycloheptaamylose.

Die zu testenden Zucker wurden dem Medium in einer Konzentration von 1 % beigegeben. K.pneumoniae M5a1 war in der Lage, auf allen aufgeführten Kohlenstoffquellen zu wachsen. Das Wachstum wurde jeweils bei einer O.D.₄₂₀ von 1.0 unterbrochen. Die Ansätze wurden, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

Die Resultate des Immunoblotting-Experiments zeigen (Abbildung 2), daß mit anti-CGT-Antikörpern reagierendes und mit gereinigter CGT komigrierendes Material nur dann gebildet wurde, wenn der Stamm auf Stärke oder Cyclodextrinen kultiviert worden war, nicht jedoch auf Glucose oder linearen Oligosacchariden. Lediglich nach Wachstum auf Maltoheptaamylose war eine geringe Menge an kreuzreagierendem Material nachweisbar.

Als Ursache für die fehlende CGT-Synthese bei Wachstum auf linearen Maltooligosacchariden kommen zwei Möglichkeiten in Frage:

1. Die Synthese von CGT wird nicht durch lineare Maltooligosaccharide, sondern ausschließlich durch Cyclodextrine induziert. Die Bildung des Enzyms bei Wachstum mit Stärke wäre dann auf eine minimale Restexpression des cgt-Strukturgens auch ohne Induktion zurückzuführen. Das dabei in geringen Mengen synthetisierte Enzym führt zur Hydrolyse von Stärke unter Bildung von Cyclodextrinen, die dann ihrerseits wiederum als Induktoren wirken können.
2. Lineare Maltooligosaccharide wirken ebenso wie Cyclodextrine als Induktoren. Ihre Metabolisierung erfolgt jedoch sehr viel schneller als die von Cyclodextrinen. Das Ausbleiben der CGT-Produktion bei Wachstum auf linearen Maltooligosacchariden könnte demnach auf Katabolitrepession zurückzuführen sein.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

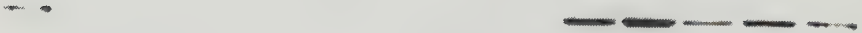


Abbildung 2:

Immunoblot-Experiment zur Untersuchung der Synthese von CGT durch *K.pneumoniae* M5a1 bei Wachstum auf: Spur 2: Glucose, 3: Maltose, 4: Maltotriose, 5: Maltotetraose, 6: Maltopentaose, 7: Maltohexaose, 8: Maltoheptaose, 9: Glucose, 10: Cyclohexaamylose, 11: Cyloheptaamylose, 12: Noredux N 150 B, 13: lösliche Stärke (p.A., Merck); Spuren 1 und 14: gereinigte CGT.

Um die Ursache für das beobachtete Synthesemuster aufzuklären, wurde die Synthese des Enzyms unter Ausschaltung der Katabolitrepression untersucht. Die Experimente wurden unter Verwendung von vier verschiedenen Kohlenstoffquellen, nämlich Glucose, Maltose, Maltotriose und Cyclohexaamylose durchgeführt. *K.pneumoniae* M5a1 wurde mit diesen Kohlenstoffquellen jeweils bis zu einer O.D.₄₂₀ von 1.0 kultiviert. Die Kulturen wurden in jeweils vier gleiche Ansätze geteilt und wie folgt weiterbehandelt:

- Ansatz 1 wurde zur Aufhebung der Katabolitrepression mit zyklischem AMP (Sigma) auf eine Konzentration von 5 mM versetzt.
- Ansatz 2 wurde mit Cyclohexaamylose, die offenbar zur Induktion der CGT-Synthese führt, auf eine Konzentration von 1 % versetzt.
- Der 3. Ansatz wurde sowohl mit zyklischem AMP als auch mit Cyclohexaamylose versetzt.
- Ansatz 4 wurde als Kontrolle ohne weitere Zusätze mitgeführt.

Alle Ansätze wurden 45 min lang weiterinkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, einem Immunoblotting-Experiment unterzogen.

Wie in Abbildung 3 gezeigt, wird kein mit anti-CGT-Antikörpern reagierendes Material gebildet, wenn *K.pneumoniae* M5a1 mit Glucose, Maltose oder Maltotriose als Kohlenstoffquelle wächst. Auch die Behandlung mit Cyclohexaamylose bewirkt in diesen Fällen keine Synthese des Enzyms. Die Kultur beginnt offensichtlich erst dann, CGT zu synthetisieren, wenn Katabolitrepression durch zyklisches AMP aufgehoben wird. Behandlung mit cAMP bewirkt eine Steigerung der Enzymsynthese auch in der Kultur, die mit Cyclohexaamylose als Kohlenstoffquelle angezogen worden war. Werden Glucose oder Maltotriose als Kohlenstoffquelle verwendet, kann die Produktion von CGT nach Aufhebung der Katabolitrepression durch Zugabe von Cyclohexaamylose gesteigert werden. Wächst *K.pneumoniae* M5a1 mit Maltose, wird die Synthese des Enzyms ausschließlich durch Katabolitrepression unterdrückt. Nach Behandlung mit cAMP kommt es offenbar zur vollen Induktion der CGT-Synthese. Das bedeutet, daß auch lineare Oligosaccharide, insbesondere Maltose in der Lage sind, die Expression des cgt-Strukturgens zu induzieren.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Abbildung 3:

Immunoblot-Experiment zur Untersuchung der Synthese von CGT durch *K.pneumoniae* M5a1 unter Katabolit-reprimierten bzw. de-reprimierten Bedingungen: 1: Gereinigte CGT, 2-5: Glucose als C-Quelle; 2: ohne Zusatz, 3: Zusatz von α CD, 4: Zusatz von cAMP, 5: Zusatz von α CD und cAMP; 6-9: Maltose als C-Quelle 6: ohne Zusatz, 7: Zusatz von cAMP, 8: Zusatz von α CD, 9: Zusatz von α CD und cAMP; 10-13: Maltotriose als C-Quelle; 10: ohne Zusatz, 11: Zusatz von cAMP, 12: Zusatz von α CD, 13: Zusatz von α CD und cAMP; 14-15: α CD als C-Quelle; 14: ohne Zusatz, 15: Zusatz von cAMP.

II. Isolierung von cgt-negativen Mutanten

Um über geeignete Rezipientenstämme für Klonierung und Expression des cgt-Gens zu verfügen, wurden Mutanten mit Defekten in der CGT-Synthese erzeugt:

Zu diesem Zweck wurden *K.pneumoniae* M5a1 und UN 1290 einer UV-Mutagenese unterzogen, über Nacht in permissivem Medium (Minimalmedium mit 1 % Glucose und 0.1 % Casaminosäuren) kultiviert und anschließend in nicht-permissives Medium (Minimalmedium mit 1 % Stärke und 0.1 % Casaminosäuren) überimpft. Nach Anzucht bis zur logarithmischen Wachstumsphase wurden wachsende Zellen durch Zugabe von D-Cycloserin und Ampicillin (200 bzw. 100 µg/ml) abgetötet. Mutanten mit Defekten in der CGT-Synthese, die mit Stärke als C-Quelle nicht wachsen konnten, wurden durch diesen Schritt angereichert. Der Vorgang wurde wiederholt, um eine weitere Anreicherung von cgt-negativen Mutanten zu erreichen. Nach zweimaliger Gegenselektion wurden die Zellen auf LB-Platten mit 0.5 % Amylopektin-Azur plattiert.

Stämme, die Defekte in der CGT-Synthese aufwiesen, waren, im Gegensatz zu Wildtypstamm, nicht in der Lage, farblose Hydrolysehöfe auf dem blauen Amylopektin-Azur zu bilden.

Im Mutagenese-Ansatz von *K.pneumoniae* M5a1 waren zwei von 100 Kolonien nicht mehr zur Stärkehydrolyse befähigt, in demjenigen von *K.pneumoniae* UN 1290 neun von 100. Die Kolonien wurden isoliert und auf Wachstumseigenschaften untersucht. Jeweils die in ihrem Wachstumsverhalten dem Ausgangsstamm ähnlichste Mutante wurde für weitere Versuche verwendet. Die aus der Mutagenese von *K.pneumoniae* M5a1 isolierte Mutante wurde mit RC 10, die dem Stamm *K.pneumoniae* UN 1290 entsprechende Mutante mit RC 23 bezeichnet. Die Reversionsraten lagen in beiden Fällen unter 10^{-9} .

Um die Art der zugrundeliegenden Mutation näher zu untersuchen, wurden die Mutanten RC 10 und RC 23 in einem Immunoblotting-Experiment auf CGT-Bildung analysiert. Dazu wurden sie in Minimalmedium mit 1 % Noredux N 150 B, 0.5 % Trypton und 0.25 % Hefeextrakt bis zu einer O.D.₄₂₀ von 1.0 angezogen. Die Aufbereitung der Kulturen erfolgte in gleicher Weise wie unter C.I. beschrieben. Als Kontrollen wurden Kulturen von *K.pneumoniae* M5a1 und KAY 2026, einem Stamm, der nicht zum Abbau von Stärke befähigt ist, mitgeführt. Wie in Abbildung 4 gezeigt, war nur *K.pneumoniae* M5a1 in der Lage, unter diesen Bedingungen immunologisch reagierendes Material zu synthetisieren. Die beiden Mutanten *K.pneumoniae* RC 10 und RC 23 waren nicht mehr fähig, CGT zu bilden. Das Experiment zeigt, daß die Mutationen nicht zur Inaktivierung, sondern zum Syntheseausfall von CGT führen.

1 2 3 4 5

Abbildung 4:

Immunoblot-Experiment zur Untersuchung der Synthese von CGT durch: 1: *K.pneumoniae* M5a1, 2: *K.pneumoniae* RC 10, *K.pneumoniae* RC 23, 4: *K.pneumoniae* KAY 2026; 5: gereinigte CGT.

Um die Mutanten auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde aus den Stämmen *K.pneumoniae* RC 10 und RC 23 Gesamt-DNS isoliert. Die DNS wurde mit der Restriktionsendonuklease Pst I gespalten und nach Auftrennung in einem 0.6 %igen Agarosegel auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Als Kontrolle wurde Gesamt-DNS aus *K.pneumoniae* M5al mitgeführt. Als DNS-Sonde wurde ein 2.55 kb großes Eco RI-Eco RV-Fragment des Plasmids pCM 100, das die gesamte für CGT kodierende Nukleotidsequenz enthält, verwendet (siehe C.IV.). Das Fragment wurde mittels "nick-translation" mit 32 Phosphat markiert und mit der auf den Filter übertragenen DNS hybridisiert.

Wie in Abbildung 5 gezeigt, sind Hybridisierungssignale mit Pst I-Fragmenten von pCM 100 und DNS aus den *K.pneumoniae*-Stämmen M5al und RC 23 zu beobachten, nicht jedoch mit DNS des Stammes RC 10.

Die Größe aller hybridisierenden Pst I-Fragmente war identisch und wurde nach der Laufstrecke auf 5.4 kb bestimmt. Da die DNS von *K.pneumoniae* RC 10 kein Pst I-Fragment enthält, das mit der für CGT kodierenden DNS Hybridisierungssignale liefert, handelt es sich bei diesem Stamm offenbar um eine Deletionsmutante, der die gesamte cgt-Strukturgenregion fehlt. Mit DNS des Stammes RC 23 war ein Hybridisierungssignal zu beobachten. Die Größe des hybridisierenden Pst I-Fragments stimmte mit der des entsprechenden Wildtyp-Fragments überein. Dieses Resultat läßt 2 Möglichkeiten zur Erklärung für das vollständige Fehlen von CGT-Synthese durch diese Mutante zu:

1. Eine Punktmutation oder kurze Deletion führt im für den aminoterminalen Anteil der CGT kodierenden Genbereich zur Einführung eines Stop-Kodons ("nonsense"-Mutation) oder zu einem Rasterschub ("frameshift"-Mutation), die bei der Translation zu einem Abbruch der Proteinsynthese führen, so daß nur ein sehr kurzes, nicht nachweisbares Genprodukt entsteht.
2. Eine Punkt- bzw. Deletionsmutation im Promotorbereich führt zu Verminderung bzw. Unterdrückung der Expression des cgt-Strukturgens.

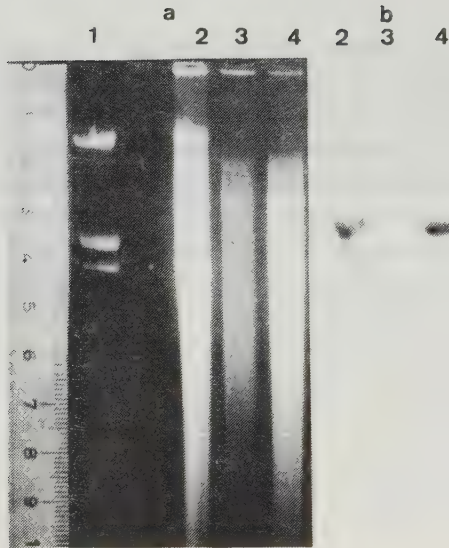


Abbildung 5:

a: Pst I-Restriktionsfragmente nach Elektrophorese in 0.6 % Agarose: 1: Größenstandard (λ -DNS x Eco RI/Hind III); 2: Gesamt-DNS aus *K.pneumoniae* M5a1, 3: Gesamt-DNS aus *K.pneumoniae* RC 10, 4: Gesamt-DNS aus *K.pneumoniae* RC 23;
b: Autoradiogramm nach Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten, 2.55 kb großen Eco RI/Eco RV-Fragment, das das gesamte cgt-Strukturgen enthält.

Bender (1977b) postulierte die Existenz einer intrazellulären Form der CGT, die an der Ringöffnung von Cyclodextrinen beteiligt sein soll. Sollte intrazelluläre CGT am CD-Abbau mechanistisch beteiligt sein, so dürfen die Mutanten RC 10 und RC 23 nicht mehr in der Lage sein, Cyclodextrine zu linearisieren und demzufolge auf Cyclodextrinen als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Um dies zu untersuchen, wurde das Wachstum der Deletionsmutante *K.pneumoniae* RC 10 in Minimalmedium mit 1 % Cyclohexaamylose als Kohlenstoffquelle verfolgt. Zum Vergleich wurde der Wildtyp *K.pneumoniae* M5a1 mitgeführt. Es zeigte sich, daß die Mutante durchaus mit Cyclohexaamylose als einziger Kohlenstoffquelle

zu wachsen vermag. Nach einer im Vergleich zum Wildtypstamm verlängerten "lag"-Phase konnte RC 10 sich mit etwas erhöhter Verdopplungszeit vermehren. Wurde das Medium mit 0.1 % Casaminosäuren supplementiert, wies die Mutante die gleiche Verdopplungszeit auf wie der Wildtyp (Tabelle 5). Das Ergebnis zeigt, daß der Stamm RC 10 über ein Enzym verfügen muß, das Cyclodextrine auch ohne die Wirkung von CGT öffnen kann. Eine intrazelluläre Form der CGT scheint zur Ringöffnung nicht nötig zu sein.

Tabelle 5: Verdopplungszeiten von K.pneumoniae M5a1 und RC 10 in Minimalmedium mit Cyclohexaamylose und Glucose als C-Quellen

	K.pneumoniae M5a1	K.pneumoniae RC 10
1 % Cyclohexaamylose	60 min	78 min
1 % Cyclohexaamylose		
0.1 % Casaminosäuren	45 min	45 min
1 % Glucose	60 min	n.b.
1 % Glucose		
0.1 % Casaminosäuren	40 min	38 min

III. Klonierung des cgt-Strukturgens aus K.pneumoniae M5a1

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe gentechnologischer Methoden eine steuerbare Expression des cgt-Strukturgens zu erzielen. Dafür war die Klonierung des Gens und die Kenntnis seiner Nukleotidsequenz Voraussetzung.

Die Klonierung des cgt-Strukturgens wurde nach dem in Abbildung 6 gezeigten Schema durchgeführt:

Gesamt-DNS aus K.pneumoniae M5a1 wurde mit Pst I gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden mit dem in gleicher Weise vorbehandelten Vektor pHE 3 ligiert; der Ligationsansatz wurde zur Transformation von E.coli RR 28 verwendet.

Die Zellen wurden auf Werkmann-Minimalmedium mit 1 % Glucose als Kohlenstoffquelle, das zur Supplementierung der Auxotrophien je 40 µg/ml Prolin und Leucin sowie 5 µg/ml Thiamin und zur Selektion 20 µg/ml Chloramphenicol (CM) und 200 µg/ml para-Fluorphenylalanin (pFp) enthielt, plattiert.

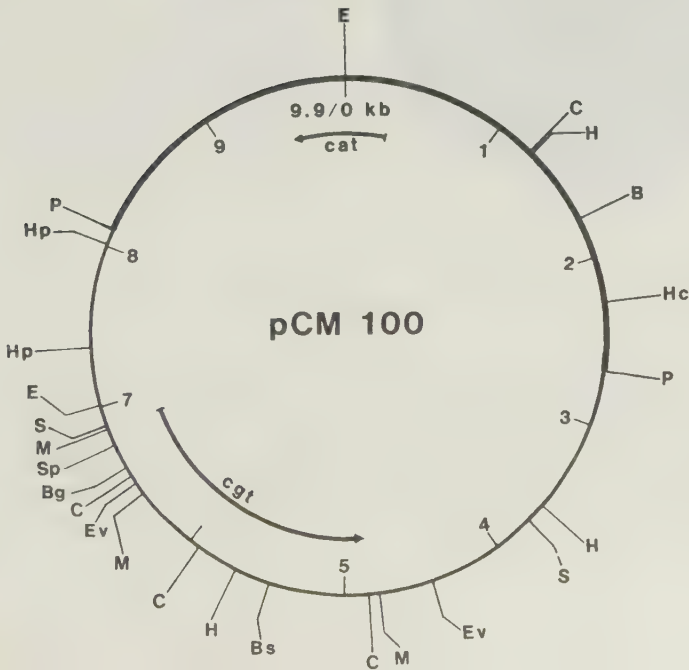
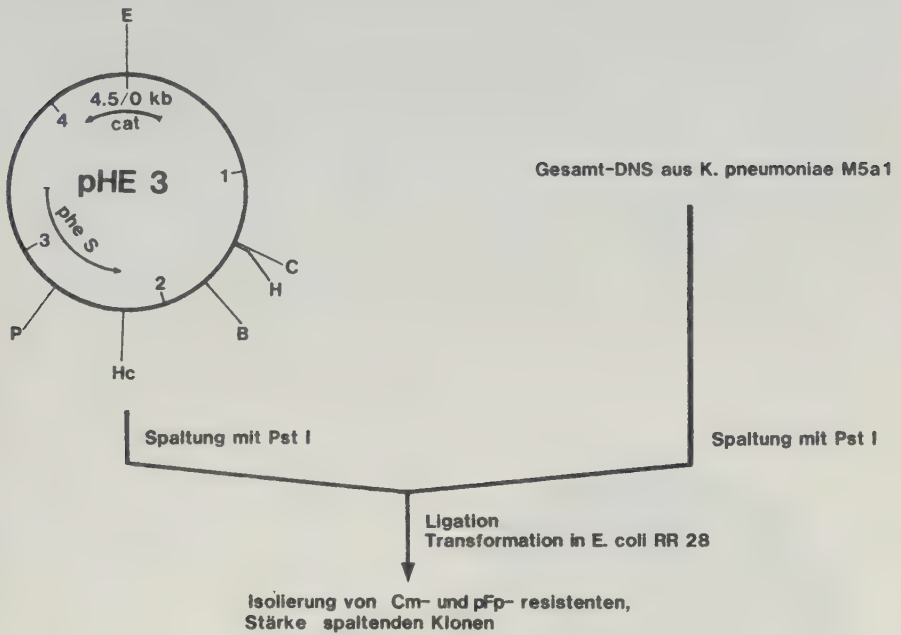
CM- und pFp-resistente Kolonien wurden auf LB-Platten, die 0.5 % Amylopektin-Azur (Sigma) enthielten, ausgestrichen und 24 h bei 30°C bebrütet.

Kolonien, die zur Stärkehydrolyse befähigt waren, wurden durch Bildung eines farblosen Abbaufleckes auf dem blauen Amylopektin-Azur-Agar sichtbar (Abbildung 7). Aus mehreren Klonierungsansätzen wurden Stärke hydrolysierende Klone in einer Häufigkeit von 1/4000 isoliert.

Abbildung 6:

Klonierung des cgt-Strukturgens aus K.pneumoniae M5a1:
Länge und Transkriptionsrichtung von Genen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Abkürzungen für Strukturgene: cat: Chloramphenicol-Acetyl-Transferase, pheS: Phenylalanyl-tRNS-Synthetase, cgt: Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase; Abkürzungen für Restriktionsschnittstellen: B: Bam HI, Bg: Bgl II, Bs: Bst EII, C: Cla I, E: Eco RI, Ev: Eco RV, H: Hind III, Hc: Hinc II, Hp: Hpa I, M: Mae I, P: Pst I, S: Ssp I, Sp: Sph I.

Abbildung 6: Legende: Siehe vorhergehende Seite



Aus Stärke hydrolysierenden Klonen wurde Plasmid-DNS isoliert. Die erhaltenen rekombinanten Plasmide, die sich im Verlauf der weiteren Experimente als identisch erwiesen, wurden zur Transformation der *K.pneumoniae*-Stämme RC 10 (cgt), KAY 2026 (von Natur aus nicht zur Stärkehydrolyse befähigt) herangezogen.

Wie aus Abbildung 7 zu ersehen ist, waren Transformanten in der Lage, Stärke zu hydrolysieren.

Das zugrundeliegende rekombinante Plasmid wurde mit pCM 100 bezeichnet.

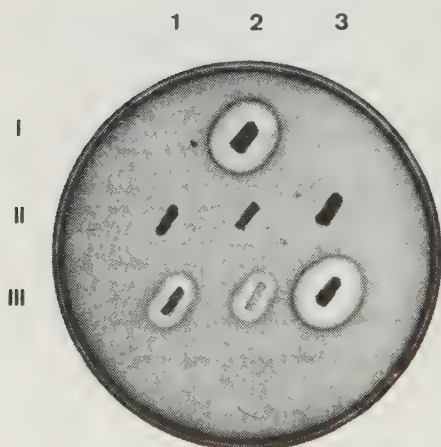


Abbildung 7:

Stärkehydrolyse durch
K.pneumoniae und *E.coli*:
II: ohne Plasmid,
III: transformiert mit
pCM 100; 1: *E.coli* RR 28,
2: *K.pneumoniae* KAY 2026,
3: *K.pneumoniae* RC 10;
I.2: *K.pneumoniae* M5a1

Zum weiteren Nachweis dafür, daß das rekombinante Plasmid pCM 100 das cgt-Strukturgen trägt, wurde ein Immunoblotting-Experiment durchgeführt.

Dazu wurden die Stämme *K.pneumoniae* M5a1, *E.coli* RR 28 sowie *E.coli* RR 28 mit dem rekombinanten Plasmid pCM 100 in Minimalmedium mit Noredux N 150 B bis zu einer O.D.₄₂₀ von 1.0 kultiviert. 500 µl der Kulturen wurden zentrifugiert, der Überstand gegen 3 mM Tris/Cl⁻ pH 7.2; 0.5 mM CaCl₂ dialysiert, lyophilisiert und in 50 µl Applikationspuffer (Laemmli und Favre,

1973) aufgenommen. 500 µl Kultur wurden ohne Zentrifugation in gleicher Weise behandelt. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE in einem 12.5 % Gel wurden mit Antikörpern gegen CGT reagierende Proteine durch Immunoblotting nachgewiesen.

Wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist, ist der Stamm E.coli RR 28 (pCM 100) in der Lage, reagierendes Material zu bilden.

Durch das Plasmid pCM 100 wurde demnach die Fähigkeit zur Bildung von CGT übertragen. Das Protein wird von E.coli RR 28 nicht nur synthetisiert, sondern auch ins Medium sezerniert, wenn auch in geringerem Umfang als von K.pneumoniae M5al.

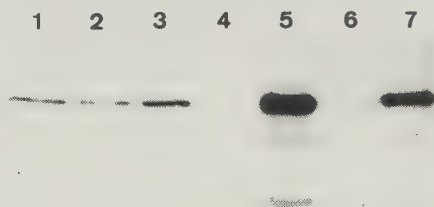


Abbildung 8:

Immunoblot-Analyse der cgt-Expression durch K.pneumoniae M5al und E.coli RR 28 mit Noredox N 150 B als Kohlenstoffquelle.
1: Gereinigte CGT; 2: E.coli RR 28 (pCM 100), Überstand;
3: K.pneumoniae M5al, Überstand; 4: E.coli RR 28, Überstand;
5: E.coli RR 28 (pCM 100), Kultur; 6: E.coli RR 28, Kultur;
7: K.pneumoniae M5al, Kultur.

Bei Kultivierung von E.coli RR 28 (pCM 100) auf Minimalmedium mit Stärke als einziger Kohlenstoffquelle konnten keine Unterschiede im Wachstumsverhalten im Vergleich zum nicht-transformierten Stamm festgestellt werden. Das bedeutet, daß die Fähigkeit zur Hydrolyse von Stärke zu Cyclodextrinen E.coli nicht in die Lage versetzt, diese Kohlenstoffquelle zu verwerten.

Die Bildung von Hydrolysehöfen unterblieb, wenn E.coli RR 28 (pCM 100) auf LB-Platten mit 0.5 % Amylopektin-Azur, die 2 % Glucose enthielten, angezogen wurde. Dies legt den Schluß nahe, daß die Expression des cgt-Strukturgens in E.coli ebenfalls über Katabolitrepression reguliert wird.

IV. Restriktionskartierung, Suklonierungsexperimente

Durch Restriktionskartierung wurde die Größe des Inserts von pCM 100 auf 5.4 kb bestimmt. Die Positionen der Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen sind in Abbildung 6 gezeigt.

Um zu testen, ob das cgt-Strukturgen vollständig und zusammen mit dem homologen Promotor kloniert worden war, wurde das 5.4 kb Pst I-Insert aus dem Plasmid pCM 100 isoliert und mit pHE 3 x Pst I ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden Zellen von E.coli RR 28 transformiert. Die Selektion erfolgte in der gleichen Weise, wie sie bereits für die Klonierung des cgt-Gens beschrieben wurde. Aus Stärke spaltenden Klonen wurde Plasmid-DNS isoliert. Die Orientierung des Pst I-Inserts mehrerer Plasmide wurde durch Restriktionskartierung festgelegt. Das Resultat zeigte, daß eine Klonierung des 5.4 kb Pst I-Fragments in beiden möglichen Orientierungen zur Bildung von Hydrolysehöfen durch E.coli RR 28 führt. Daraus ist zu schließen, daß die Expression des cgt-Strukturgens vom homologen Promotor aus gesteuert wird.

Um den das cgt-Strukturgen umfassenden Bereich einzugrenzen, wurden Subklonierungsexperimente durchgeführt.

Dazu wurden entsprechende Restriktionsfragmente isoliert und mit Vektorfragmenten von pBR 322 bzw. pHE 3 ligiert (Tabelle 4). Mit den Ligationsansätzen wurde der E.coli Stamm RR 28 transformiert. Stärkeabbau wurde durch Ausstrich auf LB-Platten mit Amylopektin-Azur nachgewiesen. Größe und Orientierung der inserierten DNS-Fragmente wurde durch Restriktionskartierung nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Subklonierungsexperimente sind in Abbildung 9 dargestellt. Die kürzeste, für den Phänotyp "Stärkehydrolyse" kodierende Region konnte einem 2.9 kb Hpa I/Eco RV-Fragment zugewiesen werden.

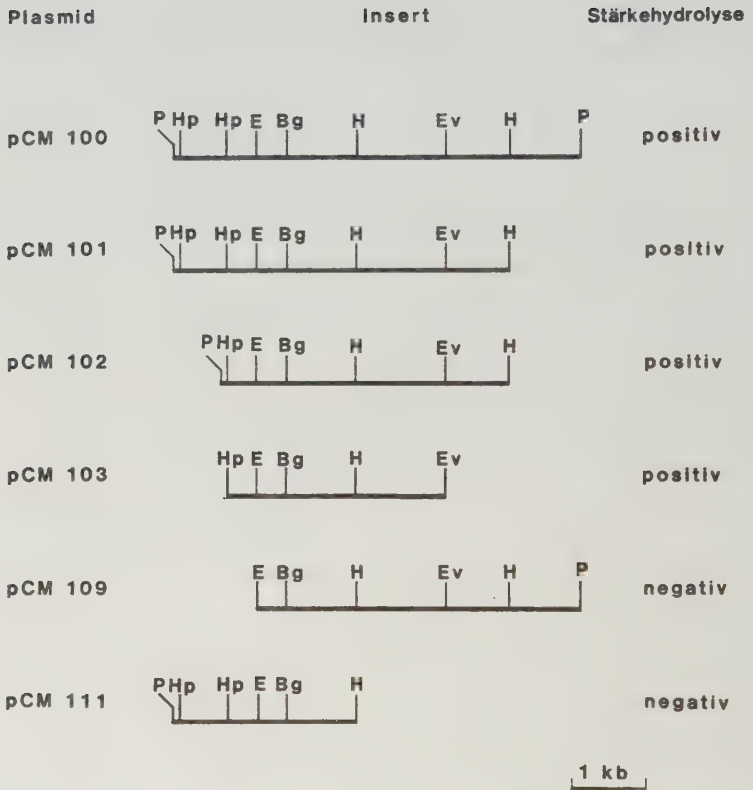


Abbildung 9:

Subklonierung des 5.4 kb Pst I-Inserts von pCM 100. Die verkürzten DNS-Fragmente sind dargestellt. Abkürzungen für Restriktionsenzyme: Siehe Legende zu Abbildung 6.

V. Rückhybridisierungen

Um zu zeigen, daß die in Vektor pHE 3 inserierte DNS aus *K.pneumoniae* stammt, wurden Rückhybridisierungsexperimente durchgeführt.

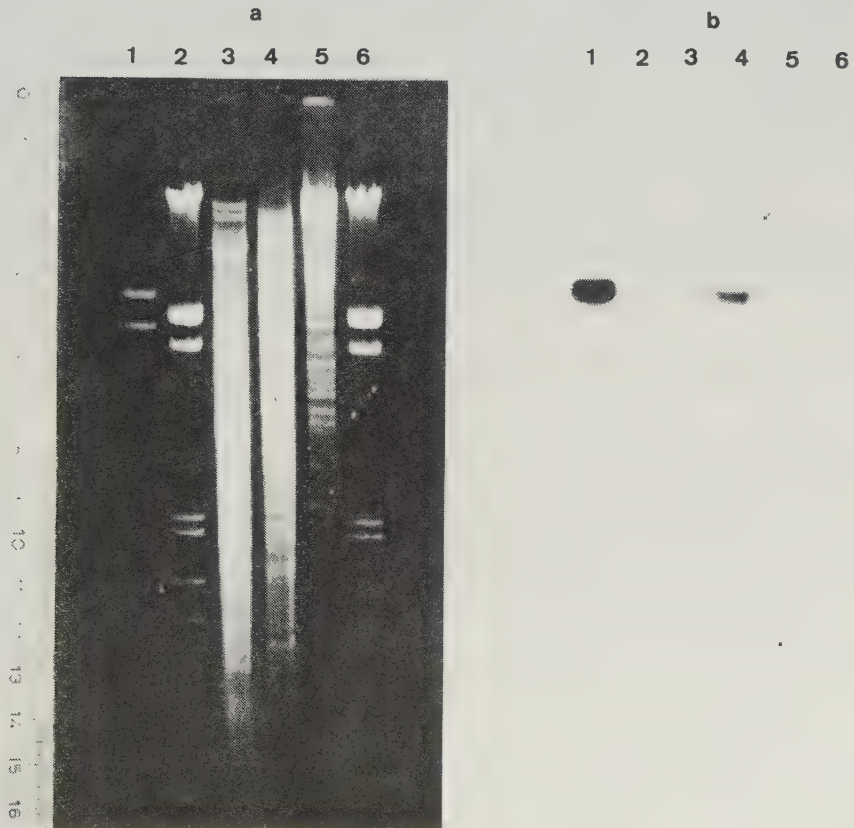


Abbildung 10:

a. Pst I-Restriktionsfragmente nach Elektrophorese in 0.6 % Agarose: 1: pCM 100, 2: Größenstandard (λ-DNS x Eco RI/Hind III), 3: Gesamt-DNS aus *K.pneumoniae* KAY 2026, 4: Gesamt-DNS aus *K.pneumoniae* M5al, 5: *E.coli* RR 28, 6: Größenstandard (λ-DNS x Eco RI/Hind III) b: Autoradiogramm nach Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten, 2.55 kb großen Eco RI/Eco RV-Fragment, welches das *cgt*-Strukturgen enthält.

Dazu wurde Gesamt-DNS aus den Stämmen *K.pneumoniae* M5a1, *K.pneumoniae* KAY 2026 und *E.coli* RR 28 mit Pst I gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden nach Auftrennung in einem 0.6 % Agarosegel auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Ein 2.55 kb Eco RI-/Eco RV-Fragment des Plasmids pCM 100, daß das gesamte *cgt*-Strukturgen enthält, wurde mit 32 Phosphat markiert und als DNS-Sonde zur Hybridisierung eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pCM 100 mit Pst I gespalten und aufgetrennt. Abbildung 10 zeigt, daß Hybridisierungssignale nur bei einem DNS-Fragment des Stammes *K.pneumoniae* M5a1 auftraten, nicht jedoch bei DNS-Fragmenten der Stämme *K.pneumoniae* KAY 2026 und *E.coli* RR 28. Das hybridisierende Pst I-Fragment aus *K.pneumoniae* M5a1 wies die gleiche Größe wie das 5.4 kb Fragment aus pCM 100 auf. Die DNS der Stämme KAY 2026 und *E.coli* RR 28 enthält demnach keine zum *cgt*-Strukturgen homologen Sequenzen.

VI. Bestimmung der Nukleotidsequenz des *cgt*-Strukturgens

Um Aufschlüsse über die Primärstruktur der CGT zu erhalten, wurde die Basensequenz des *cgt*-Strukturgens bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte nach der chemischen Spaltmethode von Maxam und Gilbert (1980). Sequenzierungsstrategie und die für die Markierung der Fragmente verwendeten Restriktionsspaltstellen sind in Abbildung 11 gezeigt.

Es wurden 2809 bp doppelsträngig sequenziert (Abbildung 12). Durch Computeranalyse wurde ein offener Leserahmen von 1965 bp gefunden, der für ein Polypeptid von 655 Aminosäureresten Länge kodiert (Abbildung 12). Aminosäurezusammensetzung und Kodonauswahl sind aus Tabelle 6 zu entnehmen.

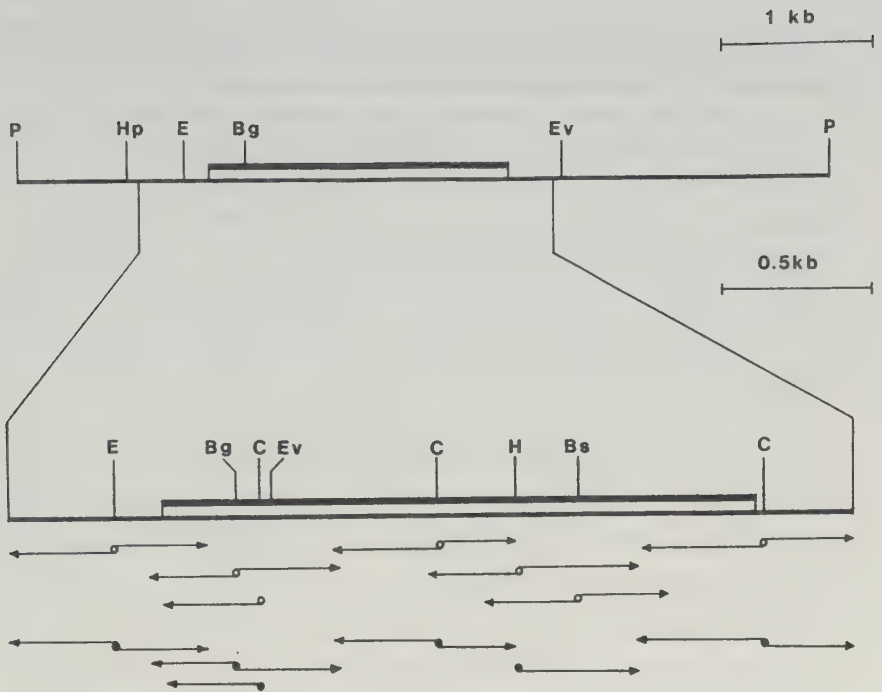


Abbildung 11:

Strategie zur Sequenzierung des cgt-Strukturgens. Im oberen Teil der Abbildung ist das 5.4 kb Pst I-Fragment des Plasmids pCM 100 dargestellt, der untere Teil der Abbildung zeigt, vergrößert, den sequenzierten Abschnitt. Der für CGT kodierende Bereich ist hervorgehoben. 5'-Markierungen werden durch Kreise angezeigt, im Fall von 3'-Markierungen sind die Kreise schwarz ausgefüllt. Die Pfeile geben Richtung und Länge der jeweils bestimmten Nukleotidsequenz an.

Abbildung 12:

Nukleotidsequenz des cgt-Strukturgens von *K.pneumoniae* M5a1 und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Das sechsfach wiederholte Hexanukleotid 5'-TTGTAG-3' ist durch Punkte gekennzeichnet, die CAP-Bindestelle ist unterstrichen. Der Bereich der Initiationsstelle der Transkription ist eingerahmt, die Ribosomenbindestelle hervorgehoben (S/D). Die Schnittstelle zwischen Signalpeptid und reifem Polypeptid ist durch einen vertikalen, die palindrome Sequenz nach dem Stop-Kodon ist durch horizontale Pfeile gekennzeichnet.

1 GCCTGTGTGTTTTGGTATTAGACGACGACATATCTCTC

39 TTGCTAGCGATGATGATGACCTTAATACCTTTGAGGGAGTTTTAACGGTGGTTGAAATATGGGAGCGAAAAATTTTATATTTATCGTGGT

134 GGAAGGAAGCTATTGGCAGAGTGTATACACAGATATTATCCATTTCATATAGGGAACCTTTAAGATTATCTTAACTAGCCTTTTGCA

229 TGTTTTGTATTCTATAATGAGAACAACTGACAAATGAAGAGTGTGATTTTTTCGTAGCTCACCTCATCACAATATATCACCAGTGCATGCA

324 AAATATACGTGTGATGGTTCCTGAATTCACGATCCTTATGAGTGAAGTCGGTTTATTGACGCTTCGATTATTTTCATCTCGCGTTGTAGTTGTAGT

419 TGTAGTTGTAGTTGTAGTTGTAGTTATTTTCAATTTAAGTGAGTTAATATAAGTAAACCTAATTTTTCACCTAATTTATTAGGACTAGATA S/D

Met Lys Asn Arg Phe Phe Asn Thr Ala Ala Ile Ala Ile Ser Ile Ala Leu Asn Thr Phe Phe Cys
514 ATG AAA Gln AAC CGT TTT TTT AAT ACC TCG GCT GCT AAT GCC ATT TCG ATT GCA TTA AAT ACT TTT TTT TGT

Ser Met Glu Thr Ile Ala Ala Glu Thr Tyr Leu Asn Phe Arg Lys Glu Thr Ile Tyr Phe Leu
586 AGC ATG CAG ACG ATT GCT GCT GAA CCA GAA GAA ACT TAT CTT GAT TTT CGT AAG GAG ACG ATA TAT TTT CTA

Phe Leu Asp Arg Phe Ser Asp Gly Asp Pro Ser Asn Asn Ala Gly Phe Asn Ser Ala Thr Tyr Asp Pro Asn
658 TTC CTT GAT CGT TTC ACG GAT GGA GAT CCA AGT AAT AAT AAT GCA GGG TTT AAT TCT GCA ACC TAC GAT CCT AAT

Asn Leu Lys Lys Tyr Thr Gly Gly Asp Leu Arg Gly Leu Ile Asn Lys Leu Pro Tyr Leu Lys Ser Leu Gly
730 AAT TTA AAA AAA TAT ACT GGA GAT CTA CTC CGG GGG TTT ATT AAT AAA CTA CCC TAT TTA AAN TCA CTT GGT

Val Thr Ser Ile Trp Ile Thr Pro Pro Ile Asn Val Asn Asn Thr Asn Ala Ala Gly Asn Thr Tyr Gly Tyr
802 GTT ACT TCA ATC TGG ATT ACT CCC CCA ATC GAT AAT GTG AAT AAT ACT GAT GCT GCT GGC AAT ACT GGA TAT

His Gly Tyr Trp Gln Gly Arg Asp Tyr Phe Thr Arg Ile Asn Glu His Phe Gly Asn Leu Asp Asp Phe Lys Glu Leu
874 CAT GGT TAT TGG GGA AAG GAT TAT TTT CGT ATA GAT AAT GAA CAT TTT GGC AAT CTC GAT PTC AAA GAA CTG

Thr Ser Leu Met His Ser Pro Asp Tyr Asn Met Lys Leu Val Leu Asp Tyr Ala Pro Asn His Ser Asn Ala
946 ACT AGT TTG ATG CAT ACT CCT GAT TAT AAT ATG AAA CTG GTT CTT GAT TAT GCC CCT AAT CAT TCG AAT GCT

Asn Asp Glu Asn Glu Phe Gly Ala Leu Tyr Arg Asp Gly Val Phe Ile Thr Asp Tyr Pro Thr Asn Val Ala
1018 AAT GAT GAA AAT GAA TTT GGT GCA CTA TAT CGT GAT GGT GTG TTT ATT ACT GAT TAT CCT ACG AAT GTT GCC

Ala Asn Thr Gly Trp Tyr His Asn Gly Gly Val Thr Asn Trp Asn Asp Phe Phe Gln Val Lys Asn His
1090 GCC AAT ACG GGC TGG TAT CAT CAC AAT GGT GGG GTA ACG AAC TGG AAT GAT TTC TTC CAA GTG AAG AAT CAT

Asn Leu Phe Phe Asn Leu Ser Asp Leu Asn Gln Ser Asn Thr Asp Val Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp Gly Ser Lys
1162 AAT CTA TTC AAT CTA TCA GAC CTC AAT CAA TCC AAT ACT GAT GTC TAC CAC TAC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT

Phe Trp Ile Asp Ala Gly Val Asp Ala Ile Arg Ile Asp Ala Ile Lys His Met Asp Lys Ser Phe Ile Gln
1234 TTT TGG ATC GAT GCT GGT GTG GAT GCT ATC AGG ATT GAT GCC ATC AAG CAT ATG GAC AAG TCT TTT ATA CAG

Lys Trp Thr Ser Asp Ile Tyr Asp Tyr Ser Lys Ser Ile Gly Arg Glu Gly Phe Phe Phe Gly Glu Trp
1306 AAA TGG ACC ACG GAT ATT TAT GAT TAC AGT AAG TCT ATC GGC CGG GAA GGA TTT TTT TTC TTC GGT GAA TGG

Phe Gly ACC Ser Ala Asn Thr Thr Thr Thr Gly Val Asp Gly Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Asn Thr Ser Gly Ser
1378 TTT GGT GCC AGT GCG AAT ACT ACT ACA ACA GAT GGT GAT GGT AAT GCT ACT GAT TAC GCC AAN ACT TCC GGG TCA

Ala Leu Leu Asp Phe Gly Phe Arg Asp Act Thr Leu Glu Arg Val Leu Val Gly Arg Ser Gln Asn Thr Met Lys
1450 GCG TTG CTG GAT TTT GGA TTC CGC GAT ACT TTA GAA AGA GTT TTG TTA GGA CGT AGC GGA AAT ACA ATG AAA

Thr Leu Asn Ser Tyr Leu Ile Lys Arg Gln Thr Val Phe Thr Ser Asp Asp Trp Gln Val Val Phe Met Asp
1522 ACG TTA AAT AGT TAT CTG ATA AAA AGA CAA ACA GTC TTT ACC AGT GAT GAC TGG CAG GTT GTT TTT ATG GAT

Asn His Asp Met Ala Arg Ile Gly Thr Thr Leu Arg Ser Asn Ala Thr Thr Phe Gly Pro Gly Asn Asn Glu
1594 AAC CAT GAT ATG GCA CGC ATT GGT ACC GCT CTG CGT TCA AAC GCC ACT ACT TTT GGT CCT GGA AAT AAT GAA

Thr Gly Gln Ser Phe Gln Ser Glu Ala Phe Ala Gln Lys Arg Ile Asp Gly Leu Val Thr Thr Met Thr Val
1666 ACC GGT GGA AGT GAC AGT GAA GCT TTT GCT CAC AAA COT ATA GAC CTC GGT CTG GTT GCG ACA ATG ACT GTA

Arg Gly Ile Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu His Tyr Ala Ala Asn Phe Thr Ser Asn Ser Phe Gly Gln
1738 CGT GGT ATT CCT GCC ATT TAT TAT GGT AAT GAA CAT TAT GCC GCT AAT TTT ACC TCT Asn Ser Phe Gly Gln

Val Gly Ser Asp Pro Tyr Asn Arg Glu Lys Met Pro Gly Phe Asp Thr Glu Ser Glu Ala Phe Ser Ile Ile
1810 GTT GGC AGT GAT CCT TAC AAC CGA GAG AAA ATG CCA GGA TTT GAT ACG GAA AGT GAG GCT TTC TCC ATT ATT

Lys Thr Leu Gly Asp Leu Arg Lys Ser Asp Pro Ala Ile Gln Asn Gly Thr Tyr Thr Glu Leu Trp Val Asn
1882 AAA ACA CTG GGT GAC CTA AGG AAA AGT AGC CCG GCA ATT CAA AAT GGA ACT TAT ACT GAA CTA TGG GTT AAT

Asp Asp Ile Leu Val Phe Glu Arg Arg Ser Gly Asn Asp Ile Val Ile Val Ala Leu Asn Arg Gly Glu Ala
1954 GAT GAT ATA TTA TTT GAG CGG CGT TCT GGG AAC GAT ATT GTT ATT GTT GCA CTT AAT CGT GGT GAG GCT

Asn Thr Ile Asn Val Lys Asn Ile Ala Val Pro Asn Gly Val Tyr Pro Ser Leu Ile Gly Asn Asn Ser Val
2026 AAC ACA ATT AAT GYT AAA AAT ATA CGG GTT CCT AAT GGG GTA TAT CCT AGT TTG ATT GGG AAT AAT AGT GTT

Ser Val Ala Asn Lys Arg Thr Thr Leu Met Lys Gln Asn Glu Ala Val Val Ile Arg Thr Ser Gln Ser Asp
2098 TCA GTA GCA AAT AAA CGG ACA ACA CTA ACA CTT ATG CAA AAT GAA GCT GTT GTC ATT CGC TCA CAA TCA GAT

Asp Ala Glu Asn Pro Thr Val Gln Ser Ile Asn Phe Thr Cys Asn Asp Gly Tyr Thr Ile Ser Gly Gln Ser
2170 GAT GCG GAG AAC CCT ACA GTA CAA AGC ATA AAC TTC ACA TGT AAT AAC GGT TAT ACG ATT TCA GGT CAA ACT

Val Tyr Ile Ile Gly Asn Ile Pro Gln Leu Gly Gly Trp Asp Leu Thr Lys Ala Val Lys Ile Ser Pro Thr
2242 GTT TAT ATT ATT GGT AAT ATA CCT GAG TTA GGT GGT TGG GAC TTA ACT AAA GCG GTA AAA ATA TCA CCG ACA

Gln Tyr Pro Gln Trp Ser Ala Ser Leu Glu Lys Pro Ser Ser Gly Asn Asn Gln Phe Asn Ser Asn Asp Thr
2314 CAA TAT CCA CAA TGG AGT GCG AGC TTA GAG CTT CCT TCT GAC TTA AAT GTT GAA TGG AAG TGT GTC AAA CGT

Asn Glu Thr Asn Pro Thr Ala Asn Val Glu Trp Lys Ser Gly Ala Asn Asn Gln Phe Asn Ser Asn Asp Thr
2386 AAT GAA ACC AAT CCG ACG GCT AAT GTT GAG TGG CAG TCT GGT GCA AAT AAC CAG TTC AAT AGC AAT GAC ACA

Gln Thr Thr Asn Gly Ser Phe *** TTAATAATTTAGTGACCAGCGTTCCCAATCGATGGTCCACTATTGCTATCCGGCCATAATTAT
2458 CAA ACA ACG AAT GGC TCG TTT TAA

2545 TTTTGACTAATCTCTTACAAATTTTCAACCTAGGCTGATGTGACTACATATTTTGTGTACGCGGACCTGGTCTGCGTCTATTAGATG

2640 AAGATGTATATCCATTTCACCTTCACGAAATACTAAATAGCTGCGCAAAATAGTAGATCATTTTAAGGAACCTACGCCGGATTATGCGATCTGA

2735 TCAATCGCCAAACCAACCAATAATCAACACCGGACTAAGCGATGTCGATCATAGCACCAATACCCGTCACCGAAC

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung der CGT-Primärstruktur und Auswahl der dafür verwendeten Kodonen.

Die Prozentzahlen in Klammern geben den Anteil der einzelnen Aminosäuren am Gesamtprotein an.

Phe	(5.79 %)	Ser	(7.62 %)	Tyr	(4.27 %)	Cys	(0.46 %)
UUU	26	UCU	8	UAU	22	UGU	3
UUC	12	UCC	3	UAC	6	UGC	0
Leu	(6.55 %)	UCA	10				
UUA	10	UCG	4				
UUG	7						
Leu		Pro	(3.35 %)	His	(1.52 %)	Arg	(3.96 %)
CUU	7	CCU	11	CAU	9	CGU	12
CUC	4	CCC	2	CAC	1	CGC	3
CUA	8	CCA	5	Gln	(3.20 %)	CGA	1
CUG	7	CCG	4	CAA	12	CGG	4
				CAG	9		
Ile	(6.10 %)	Thr	(8.08 %)	Asn	(10.21 %)	Ser	(7.62 %)
AUU	23	ACU	20	AAU	53	AGU	17
AUC	7	ACC	8	AAC	14	AGC	8
AUA	10	ACA	15	Lys	(3.96 %)	Arg	(3.06 %)
Met	(1.68 %)	ACG	10	AAA	20	AGA	4
AUG	11			AAG	6	AGG	2
Val	(5.34 %)	Ala	(6.71 %)	Asp	(7.16 %)	Gly	(7.93 %)
GUU	19	GCU	18	GAU	39	GGU	26
GUC	3	GCC	10	GAC	8	GGC	6
GUA	8	GCA	9	Glu	(3.96 %)	GGA	13
GUG	5	GCG	7	GAA	18	GGG	7
				GAG	8		

Wie aus Abbildung 12 zu ersehen ist, zeigt der aminoterminal Bereich der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Primärstruktur der CGT die Merkmale eines Signalpeptids (Perlmann und Halvorson, 1983).

Um diesen Befund zu bestätigen, wurde die aminoterminal Aminosäuresequenz von CGT, die aus dem Kulturüberstand von *K.pneumoniae* M5a1 gewonnen und über Affinitätschromatographie an Cyclohexaamylose gereinigt worden war (G. Schmid, pers. Mitteilung), bestimmt.

Die ersten drei Aminosäuren des Aminoterminus des reifen Polypeptids konnten zweifelsfrei als H_2N -Ala-Glu-Pro bestimmt werden. Diese Sequenz ist vom Aminoterminus der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Primärstruktur der CGT durch einen 30 Aminosäuren langen Bereich mit den Charakteristika eines Signalpeptids getrennt.

Daraus ist zu schließen, daß CGT von *K.pneumoniae* M5a1 als Vorläuferprotein mit einer Länge von 655 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 72.916 synthetisiert wird. Während des Exports wird ein Signalpeptid von 30 Aminosäuren Länge abgespalten. Die Spaltung erfolgt zwischen zwei Alanin-Resten. Das resultierende reife Protein hat ein Molekulargewicht von 69.029. Dieser aus der Sequenz abgeleitete Wert stimmt gut mit den durch Molekulargewichtsbestimmungen ermittelten (68.000-70.000) überein (Abbildung 23).

VII. Expressionssignale

Die Initiationsstelle der Transkription wurde mit Hilfe von Nuklease S1 bestimmt (Abbildung 13).

Dazu wurde *K.pneumoniae* M5a1 in Minimalmedium mit Stärke bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Zellernte erfolgte zu Beginn der stationären Wachstumsphase, um - im Fall der Stärke als Kohlenstoffquelle - eine möglichst hohe Induktion zu erzielen und Katabolitrepression zu vermeiden. Im Fall von Glucose als Kohlenstoffquelle sollte die Expression des *cgt*-Strukturgens durch Katabolitrepression unterdrückt sein. Aus den Zellen wurde RNS isoliert. Ein 405 bp langes Bgl II/Eco RI-Fragment aus pCM 100, an der Bgl II-Schnittstelle 5' endmarkiert, wurde mit der RNS bei 45°C hybridisiert. Nach Behandlung mit Nuklease S1 wurden die Reaktionsprodukte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographiert.

Wie aus Abbildung 13 zu ersehen ist, kam ein Hybridisierungssignal nur mit RNS aus *K.pneumoniae* Zellen zustande, die mit Stärke als Kohlenstoffquelle gewachsen war. RNS aus Zellen, die unter Verbrauch von Glucose kultiviert worden waren, hybridisierten nicht mit dem markierten DNS-Fragment. Diese Beobachtung stimmt mit den früher erhobenen Befunden (siehe C.I.) der Regulation der Genexpression durch Katabolitrepression überein. Die Initiationsstelle der Transkription konnte, bedingt durch die ungünstige Lage der Restriktionsspaltstellen nur auf einen Bereich von ca. 5 Nukleotiden eingegrenzt werden (Abbildung 13). Der Transkriptionsstart liegt zwischen den Nukleotiden 150 und 155 5' zum Initiationskodon.

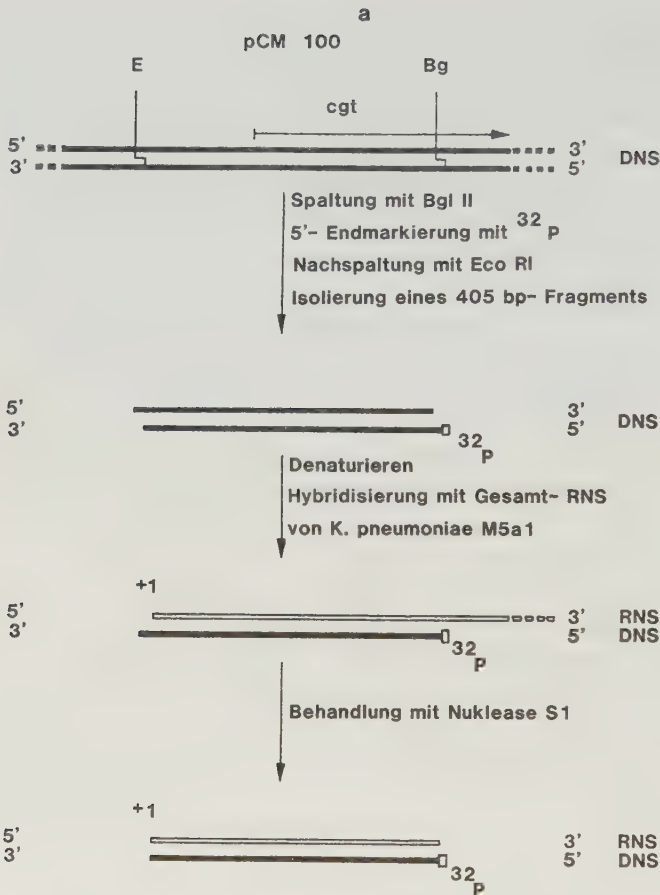
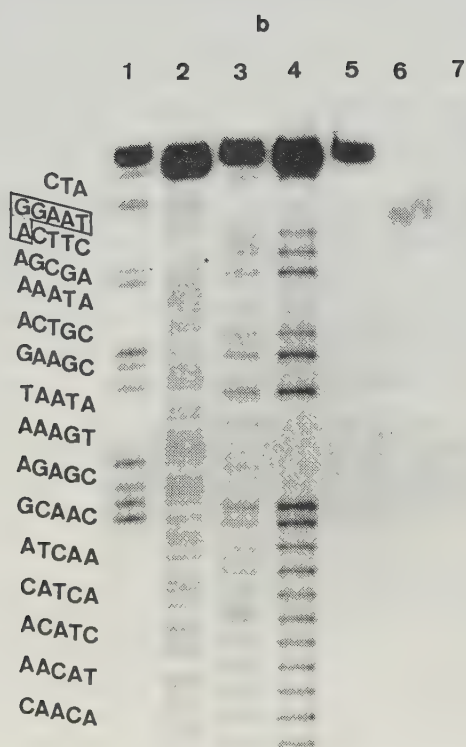


Abbildung 13:

Bestimmung der Initiationsstelle der Transkription mit Hilfe von Nuklease S1. a: Schema des Versuchsablaufs; der RNS-Strang ist durch eine Doppellinie gekennzeichnet, DNS-Stränge durch verdickte Linien; 5'- und 3'-Ende sind jeweils angegeben; 5'-Endmarkierung ist durch ein Viereck gekennzeichnet; Abkürzung für Restriktionsenzyme: E: Eco RI, Bg: Bgl II. b: Autoradiogramm von DNS-RNS-Hybriden nach Behandlung mit Nuklease S1: 1-4: Längensstandard; Sequenzansatz des 405 bp Bgl II-Eco RI-Fragments nach Maxam und Gilbert; 1: G-Reaktion, 2: A+G-Reaktion, 3: C+T-Reaktion, 4: C-Reaktion, 5: 405 bp Eco RI-Bgl II-Fragment, am Bgl II-Ende 5'-markiert; 6 und 7: RNS-DNS-Hybride nach Behandlung mit Nuklease S1; 6: RNS aus *K.pneumoniae* M5a1 nach Kultivierung mit Glucose.



Aus der Nukleotidsequenz des cgt-Strukturgens (Abbildung 12) konnten folgende Expressionssignale abgeleitet werden:

1. Zwischen der Initiationsstelle der Transkription und dem Initiationskodon liegt eine Sequenz, die alle Kriterien einer für E.coli typischen Shine/Dalgarno-Sequenz aufweist (Stormo et al., 1982). Der Abstand zwischen dieser Ribosomenbindungsstelle und dem Initiationskodon beträgt 7 Nukleotidpaare (Nt.Pos.503-506 in Abbildung 12).
2. In einem Abstand von 77-82 Nukleotiden vor der Initiationsstelle der Transkription befindet sich eine Konsensus-Binderegion für ein Katabolit-Aktivator-Protein (CAP), 5'-TGTGA-3' (de Crombrughe et al. 1984), eine Tatsache, die die Befunde über Regulation durch Katabolitrepresion bestätigt (Nt.Pos.272-277).
3. Vor der Initiationsstelle der Transkription konnten keine Sequenzen mit den Kriterien für eine Konsensus-Sequenz von E.coli-Promotoren nachgewiesen werden (Rosenberg und Court, 1979).
4. Zwischen der Initiationsstelle der Transkription und der Ribosomenbindungsstelle liegt eine auffällige, sechsfach wiederholte Sequenz 5'-TTGTAG-3' (Nt.Pos.406-441). Die Funktion dieser Sequenz ist noch unklar, sie könnte jedoch an der Regulation der Expression des cgt-Strukturgens beteiligt sein.
5. Acht Nukleotide hinter dem Stopkodon 5'-TAA-3' folgt eine palindrome Sequenz, die eine rho-unabhängige Terminationsstelle für die Transkription darstellen könnte (Rosenberg und Court, 1979; Nt.Pos.2490-2522).

VIII. Expression des cgt-Strukturgens unter Kontrolle des tac-Promotors

1. Konstruktion von tac-cgt-Fusionsplasmiden

a. Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors

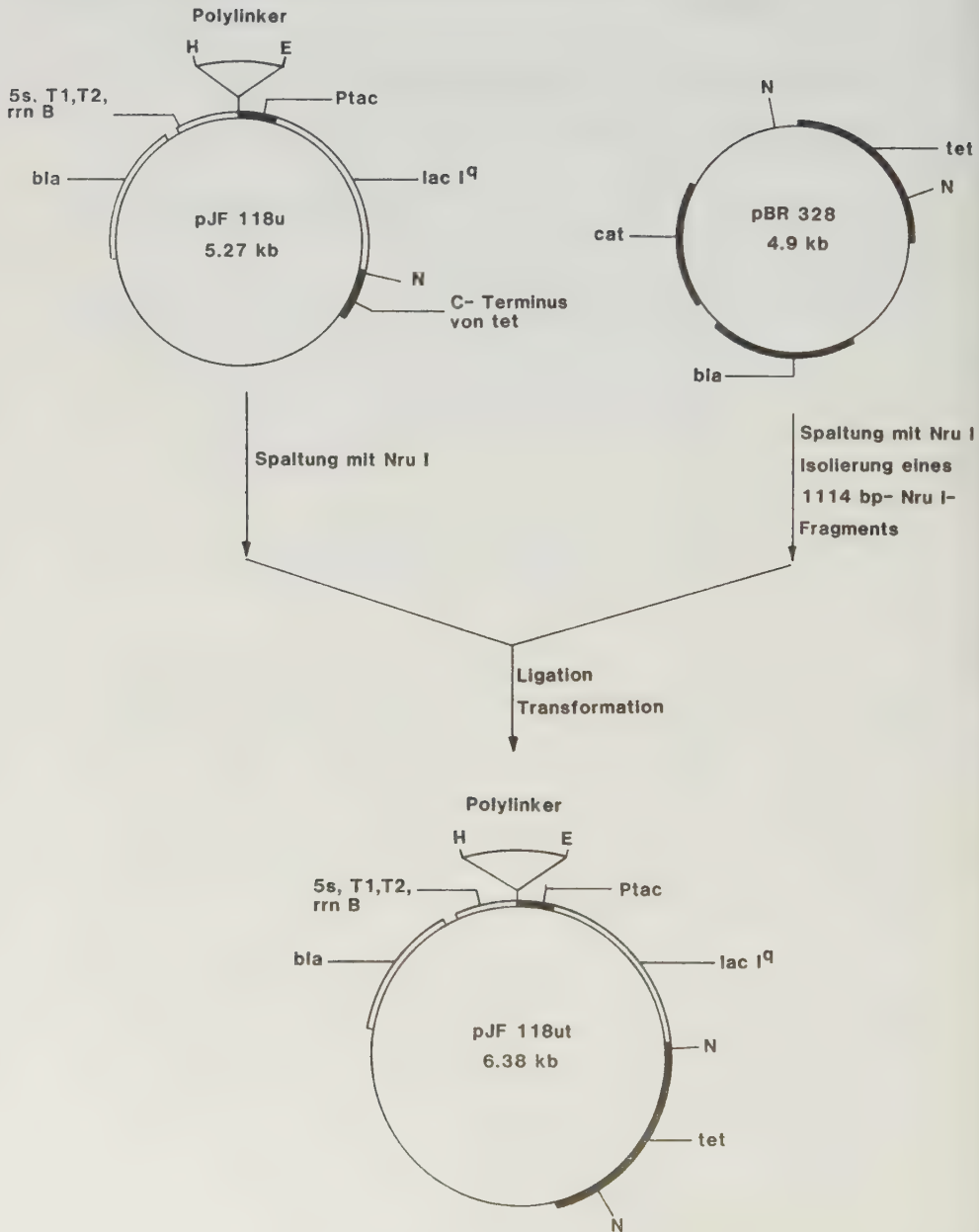
Die K.pneumoniae Stämme M5a1 und UN 1290 verfügen ebenso wie ihre cgt⁻-Abkömmlinge RC 10 bzw. RC 23 über eine β -Lactamase und sind deshalb gegen Ampicillin resistent.

Da bisher nur tac-Expressionsvektoren zur Verfügung standen (z.B. pJF 118u, P. Heinrich, pers. Mitteilung) die Ampicillin-Resistenz vermitteln, mußte ein Vektor konstruiert werden, der eine Selektion durch ein anderes Antibiotikum ermöglichte. Der Expressionsvektor pJF 118u verfügt, bedingt durch seine Konstruktion, über einen Teil eines Tetrazyklin-Resistenz vermittelnden Gens. Die für den aminoterminalen Anteil des entsprechenden Proteins kodierende Sequenz ist deletiert (Abbildung 14). Der verbleibende Sequenzanteil enthält eine Restriktionsspaltstelle für Nru I.

Ein 1.114 kb großes Nru I-Fragment, das für den aminoterminalen Teil des Tetrazyklin-Resistenz vermittelnden Proteins kodiert, wurde aus dem Plasmid pBR 328 isoliert. Der Expressionsvektor pJF 118u wurde mit Nru I linearisiert und mit dem Nru I-Fragment aus pBR 328 ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden Zellen des E.coli Stammes RR 28 transformiert und auf LB-Medium mit Tetrazyklin plattiert. Aus Tc-resistenten Transformanten wurde Plasmid-DNS isoliert und durch Restriktionskartierung überprüft.

In allen Fällen zeigte sich das erwartete Restriktionsmuster (Abbildung 14), das den Genotyp des konstruierten Vektors pJF 118u festlegt: tac-Promotor (de Boer et al., 1983), Terminator (Brosius, 1984a; Brosius 1984b), lac-Repressor, Resistenzen gegen Ampicillin und Tetrazyklin.

Abbildung 14: Legende: Siehe nächste Seite



b. Konstruktion einer tac-cgt-Transkriptionsfusion

-Isolierung des cgt-Strukturgens

Wie aus der Abbildung 6 zu ersehen ist, enthält das 5.4 kb große Pst I-Insert des Plasmids pCM 100, das für CGT kodiert, mehrere Ssp I-Spaltstellen. Eine dieser Spaltstellen liegt 18 bp vor der Strukturgen-eigenen Ribosomenbindungsstelle (Abbildung 15). Eine weitere Ssp I-Spaltstelle befindet sich, 3.85 kb davon entfernt, hinter dem cgt-Strukturgen (Abbildung 6). Um das Gen zusammen mit seiner Shine-Dalgarno-Sequenz zu isolieren, wurde das Plasmid pCM 100 mit Ssp I gespalten und das 3.85 kb große Fragment isoliert.

-Konstruktion der Transkriptionsfusion

Die Konstruktion der tac-cgt-Transkriptionsfusion ist in Abbildung 16 dargestellt. Der tac-Vektor pJF 118ut wurde mit Restriktionsendonuklease Xma I, deren Spaltsequenz im Polylinker des Vektors liegt, linearisiert und mit dem 3.85 kb Ssp I-Fragment ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden Zellen des E.coli Stammes HB 101 transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit Tetrazyklin.

Die tac-cgt-Fusion wurde über differentielle Expression aufgefunden. Dazu wurden Parallelausstriche der Transformanten auf LB-Platten mit 0.5 % Amylopektin-Azur und 20 µg/ml Tetrazyklin einerseits sowie LB-Platten mit 0.5 % Amylopektin-Azur, 20 µg/ml Tetrazyklin und 1 mM IPTG als Induktor andererseits angefertigt und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Klone, die tac-cgt-Fusionen enthielten, bildeten auf den Platten mit dem Induktor IPTG (Amman et al., 1983), trotz minimalen Wachstums, Abbauhöfe von beträchtlicher Größe; ohne Induktor blieben die Abbauhöfe in Relation zum Koloniedurchmesser relativ klein (Abbildung 22).

Abbildung 16: Legende: Siehe nächste Seite

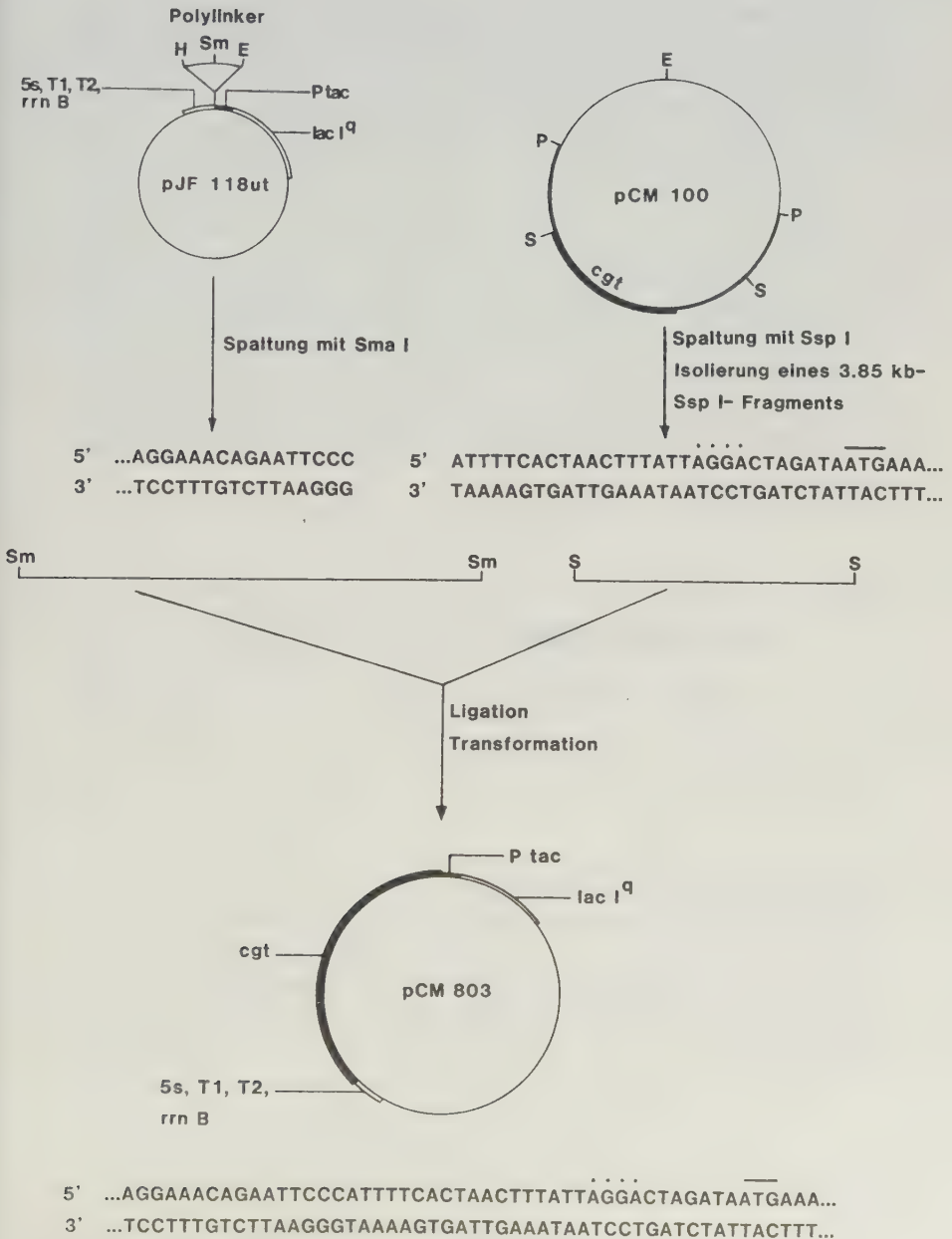


Abbildung 16:

Konstruktion einer tac-cgt-Transkriptionsfusion.
Abkürzungen: cgt: Strukturgen für Cyclodextrin-Glyosyl-Transferase; Abkürzungen für Restriktionsspaltstellen: P: Pst I, Sm: Sma I; alle anderen Abkürzungen sind der Legende zu Abbildung 14 zu entnehmen. Die Ribosomenbindungsstelle ist durch Punkte, das Initiationskodon durch einen Strich gekennzeichnet.

Aus einem in der oben beschriebenen Weise isolierten Klone wurde das Plasmid isoliert (Bezeichnung: pCM 803). Die Nukleotidsequenz der Übergangsregion zwischen tac-Promotor und cgt-Strukturgen wurde mit Hilfe der chemischen Spaltungsmethode (Maxam und Gilbert, 1980) bestimmt (Abbildung 17). Dabei konnte die nach dem Konstruktionsschema erwartete Basenfolge bestätigt werden (Abbildung 21).

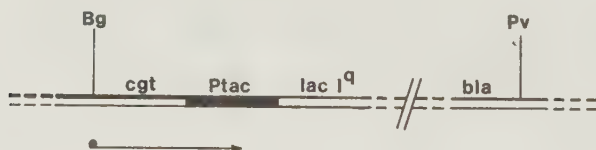


Abbildung 17:

Vorgehen zur Sequenzierung der tac-cgt-Übergangsregion von Fusionsplasmiden.

Abkürzungen für Restriktionsschnittstellen: Bg: Bgl II, Pv: Pvu I; für die anderen Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 17. Der Pfeil gibt Richtung und Länge der jeweils bestimmten Nukleotidsequenz an. In allen Fällen erfolgte 3'-Markierung des Bgl II-Endes.

c. Konstruktion von tac-cgt-Translationsfusionen

-Isolierung des cgt-Strukturgens

Um Translationsfusionen mit dem tac-Expressionsvektor pJF 118ut konstruieren zu können, mußte das cgt-Strukturgen ohne die für die Expressionssignale kodierenden Sequenzen (Promotor, Shine-Dalgarno-Sequenz) isoliert werden. Wie Abbildung 15 zeigt, befindet sich zwischen Ribosomenbindungsstelle und dem Initiationskodon eine Mae I-Spaltstelle (Nt.Pos.507 des sequenzierten Bereichs; Abbildung 6), desgleichen in der 3'-flankierenden Sequenz (Nt.Pos.2575) des cgt-Strukturgens. Da sich auch im Bereich zwischen diesen Spaltstellen eine Mae I-Schnittstelle befindet, wurde das für das Strukturgen kodierende 2068 bp Mae I-Fragment durch partielle Spaltung mit Mae I aus dem Plasmid pCM 100 isoliert.

-Konstruktion der Translationsfusionen

Um tac-cgt-Translationsfusionen zu erzeugen, wurden die 5' überhängenden Enden des 2068 bp Mae I-Fragments auf verschiedene Art und Weise behandelt:

Im ersten Fall wurden die Enden durch Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I mit dATP und dTTP aufgefüllt. Das Fragment wurde mit dem Vektor pJF 118ut, der mit Eco RI linearisiert und wie oben durch Auffüllreaktion mit glatten Enden versehen worden war, ligiert (Abbildung 18).

Im zweiten Fall wurde das Mae I-Fragment nach Auffüllreaktion mit Eco RI-Linkermolekülen versehen. Das auf diese Weise erhaltene Fragment wurde mit dem durch Eco RI linearisierten Vektorplasmid pJF 118ut ligiert (Abbildung 19).

In einem dritten Ansatz wurden die 5' überstehenden Enden sowohl des 2068 bp Mae I-Fragments als auch des durch Eco RI linearisierten Vektors pJF 118ut mit Hilfe von Nuklease S1 abgespalten. Die Fragmente wurden anschließend ligiert (Abbildung 20).

Mit den Ligationsansätzen wurden E.coli- bzw. K.pneumoniae-Stämme transformiert. Die Selektion erfolgte, wie bei der Konstruktion der tac-cgt-Transkriptionsfusion auf LB-Platten mit Tetrazyklin. Stämme, die die Translationsfusionen enthielten, wurden, wie oben beschrieben, über eine differentielle Expression isoliert. Die auf diese Weise gewonnenen Plasmide wurden mit pCM 700, 702 und 704 bezeichnet.

Aus den Klonen wurde Plasmid-DNS isoliert. Die Sequenzierung der Übergangsregion zwischen tac-Promotor und Initiationskodon wurde in der oben beschriebenen Weise durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß im Fall eines der Klone, die bei der Konstruktion des Plasmids pCM 704 entstanden waren, die Nuklease S1 offenbar nach Abspaltung des 5' überstehenden Endes ein weiteres Nukleotidpaar abgebaut hatte (Abbildung 20, 21). Dieses Plasmid wurde mit pCM 703 bezeichnet.

In den anderen Fällen stimmte die Nukleotidsequenz mit der vorhergesagten überein (Abbildungen 18, 19, 20 und 21).

Abbildung 18, 19, 20:

Konstruktion von tac-cgt-Translationsfusionen.

Abkürzungen: M: Mae I; für die anderen Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 16. Ribosomenbindungsstelle und Initiationskodon sind wie in Abbildung 16 gekennzeichnet.

Abbildung 18: Legende: Siehe vorhergehende Seite

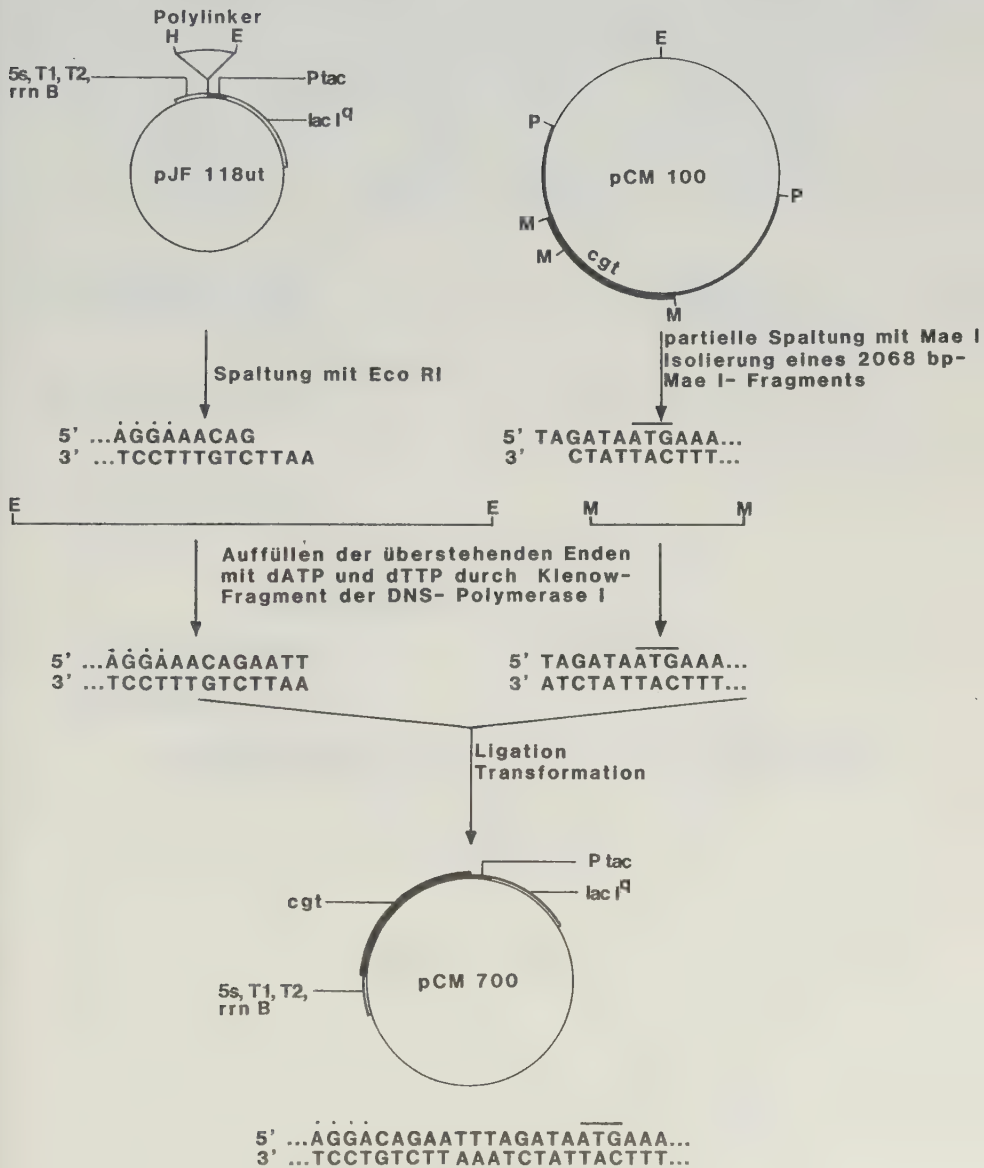


Abbildung 19: Legende: Siehe Abbildung 18

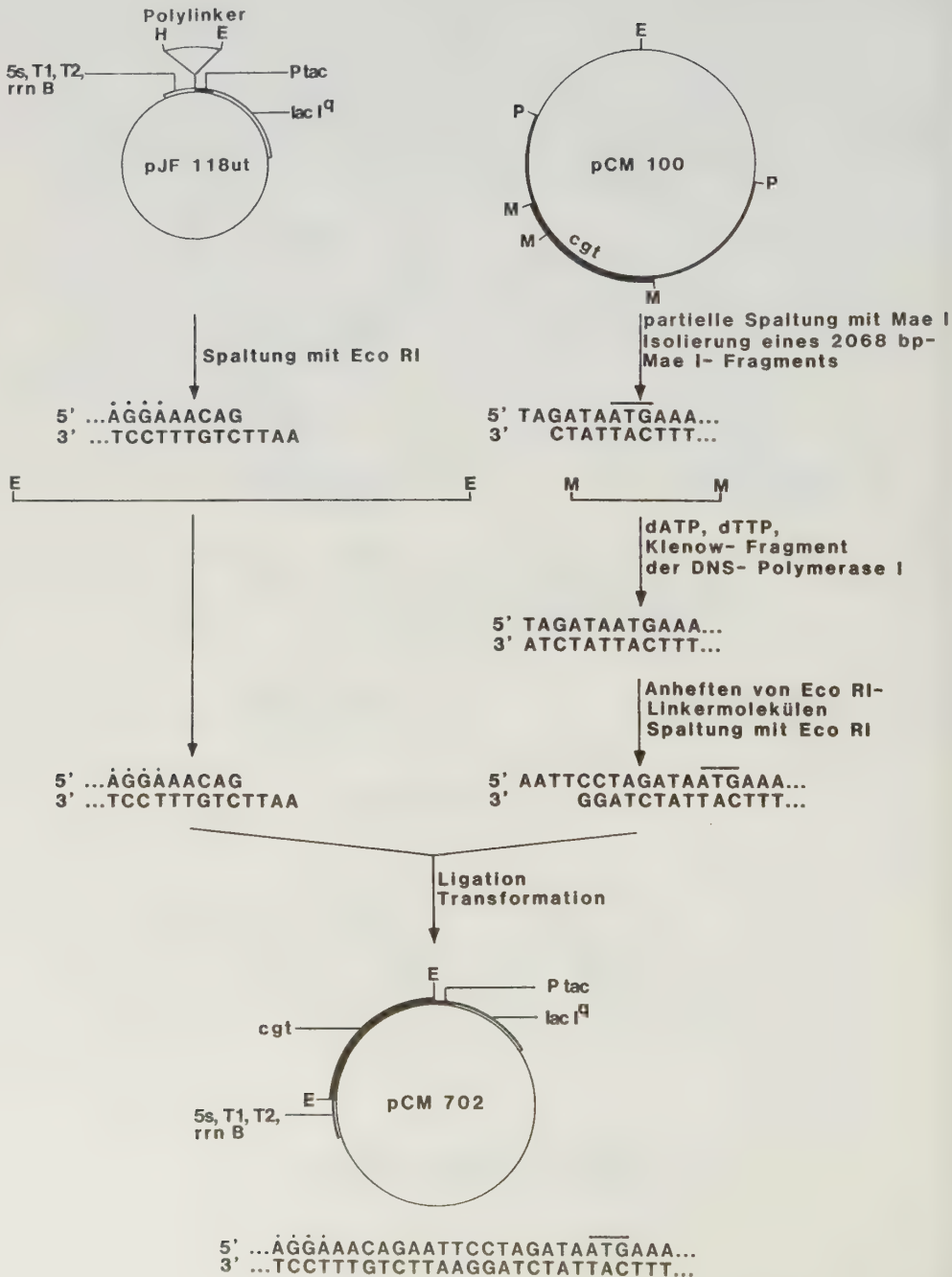
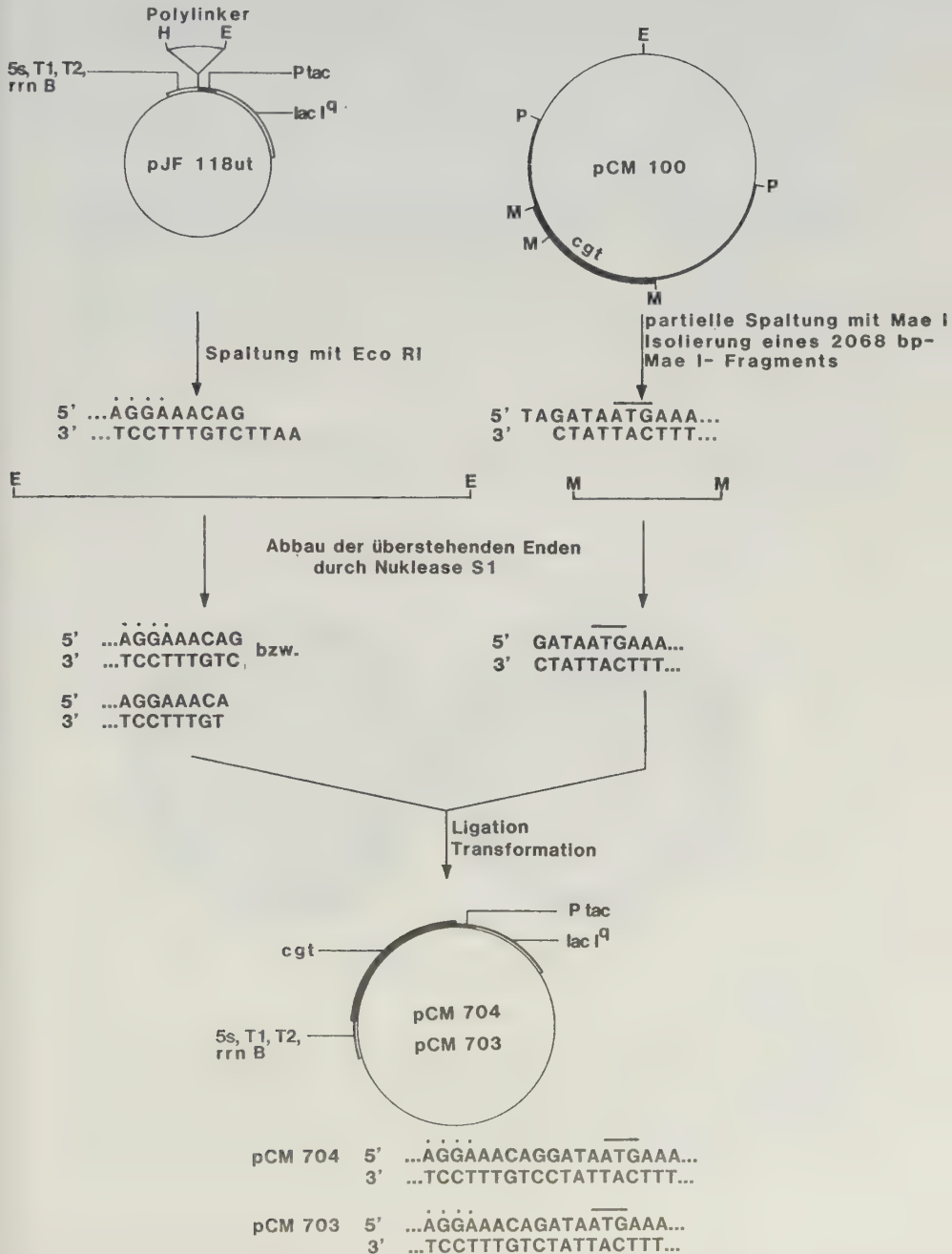


Abbildung 20: Legende: Siehe Abbildung 18



Stärkehydrolyse unter induzierenden bzw. nicht-induzierenden Bedingungen. a: LB mit 0.5 % Amylopektin-Azur, 20 µg/ml Tc; b: LB mit 0.5 % Amylopektin-Azur, 20 µg/ml Tc, 1 mM IPTG; obere Reihe: E.coli DS 410, untere Reihe: K.pneumoniae RC 10; 1: pCM 702, 2: pCM 700, 3: pCM 704, 4: pCM 703, 5: pCM 803.

2. Expressionsexperimente

a. Induktion durch IPTG

Wie bereits in Kapitel VIII.1. beschrieben, erfolgte die Isolierung der tac-cgt-Fusionen über ein Expressionsexperiment, nämlich die Bildung von Hydrolysehöfen auf Nährmediumplatten mit Amylopektin-Azur unter Einfluß des Induktors IPTG (Amman et al. 1983).

Abbildung 22 zeigt ein entsprechendes Experiment für alle konstruierten tac-cgt-Fusionsplasmide, wobei E.coli DS 410 und K.pneumoniae RC 10 als Rezipientenstämme verwendet wurden.

Aus dem Versuchsergebnis können folgende Schlüsse gezogen werden:

-Die Bildung von Hydrolysehöfen erfolgt auch ohne Induktion; sie ist im Fall von E.coli DS 410 im Vergleich zu K.pneumoniae RC 10 stärker ausgeprägt. Offenbar wurde der lac-Repressor trotz gleicher Gendosis nicht in ausreichendem Maß gebildet, um die CGT-Synthese völlig zu unterdrücken. Es treten, je nach dem Abstand zwischen Ribosomenbindungsstelle und Initiationskodon, quantitative Unterschiede auf.

-Enthält das Kulturmedium IPTG als Induktor, kommt es, wie bei Verwendung des Plasmids pCM 702 besonders gut zu sehen ist, im Vergleich zum nicht-induzierenden Medium, zur Bildung eines Hydrolysehofs. Im Fall aller anderen tac-cgt-Fusionsplasmide zieht die Induktion des tac-Promotors neben der Bildung von CGT offensichtlich eine Hemmung des Wachstums bzw. eine Lyse der Zellen nach sich. Ein auf den Durchmesser der Hydrolysehöfe bezogener quantitativer Vergleich ist daher sowohl zwischen den einzelnen Fusionen als auch zwischen induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen unmöglich. Es kann lediglich die Aussage gemacht werden, daß der Abbau von Amylopektin-Azur durch die Induktion im Verhältnis zum Zellwachstum verstärkt wird.

Zur näheren Untersuchung der Expression wurde deswegen ein Induktionsexperiment in Flüssigkultur durchgeführt. Dazu wurden *E.coli* DS 410 und *K.pneumoniae* RC 10, die jeweils das Plasmid pCM 703 enthielten, in LB-Medium mit Tetrazyklin bei 37°C bis zu einer O.D.₅₀₀ von 0.5 angezogen, anschließend mit IPTG auf eine Konzentration von 1 mM versetzt und weitere 5 h lang inkubiert. Zur Kontrolle wurden die gleichen Stämme unter nicht-induzierenden Bedingungen über denselben Zeitraum angezogen. In einem dritten Ansatz wurden die beiden Stämme, die das Plasmid pCM 703 nicht enthielten, in LB-Medium kultiviert. Das Wachstum der Kultur wird dabei etwa eine Verdopplungsperiode nach Beginn der Induktion gehemmt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung kommt es zur Lyse der Zellen.

Die Kulturen (Zellen plus Überstand) wurden 5 h nach Induktion, wie bereits in Kapitel C.III. beschrieben, dialysiert und lyophilisiert. Die Proteine wurden nach SDS-PAGE in einem 12.5 % Polyacrylamidgel mit Amidoschwarz angefärbt.



Abbildung: 23:

Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus Kulturen von *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) und *E.coli* DS 410 (pCM 703) unter induzierenden bzw. nicht-induzierenden Bedingungen. Es wurde jeweils die gleiche Menge an Zellen (40 µl einer 10fach kgⁿ-zentrierten Kultur entsprechend einer Zelldichte von 2.10⁹ Zellen/ml) aufgetragen. 1: *E.coli* DS 410, 2: *E.coli* DS 410 (pCM 703), 3: *E.coli* DS 410 (pCM 703) nach Induktion, 4: Gereinigte CGT, 5: Markerproteine, 6: *K.pneumoniae* RC 10, 7: *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703), 8: *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) nach Induktion.

Wie aus Abbildung 23 zu ersehen ist, wird bereits ohne Induktion des tac-Promotors eine geringe Menge an CGT gebildet. Die Induktion durch IPTG bewirkt eine Überproduktion des Enzyms.

Der prozentuale Anteil der überproduzierten CGT am gesamten Protein der Kulturen wurde durch Bestimmung der Farbindensität der Banden mit Hilfe eines programmierbaren Gilford-Spektral-photometers errechnet.

Der Anteil des nach Induktion des tac-Promotors gebildeten Enzyms betrug im Fall von *E.coli* DS 410 (pCM 703) ca. 21 %, im Fall von *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) 26 % des jeweils gebildeten Gesamtproteins.

Um zu untersuchen ob die überproduzierte CGT aus den Zellen ausgeschleust worden war, wurde die Enzymaktivität nach Sedimentierung der Zellen (2 min Zentrifugation in der Eppendorfsentrifuge) im Kulturüberstand bestimmt:

Die gemessene Aktivität betrug im Fall der induzierten Kultur von *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) 0.28 Einheiten/ml, im Fall der induzierten Kultur von *E.coli* DS 410 (pCM 703) 0.07 Einheiten/ml, was einer Konzentration an sezernierter CGT von 1.5 bzw. 0.35 mg/l Kulturüberstand entspricht. Diese Werte zeigen, daß der Großteil der produzierten CGT nicht ins Medium ausgeschleust, sondern innerhalb der Zellhülle zurückgehalten wurde.

Im Überstand der nicht-induzierten Kulturen konnte unter den für den Enzymtest verwendeten Bedingungen (40 µl Kulturüberstand, 60 min Inkubationszeit mit Noredox N 150 B), die eine Bestimmung der Aktivität von Enzymkonzentrationen bis 0.25 mg/l erlaubt, keine Aktivität festgestellt werden.

Bei entsprechenden Induktionsexperimenten unter Verwendung anderer tac-cgt-Fusionsplasmide konnten keine höheren Ausbeuten an sezerniertem Enzym erzielt werden, auch nicht im Fall von Plasmid pCM 702, bei dem die Induktion des tac-Promotors durch IPTG nicht zur Lyse der Zelle führt (Abbildung 22). Auch der Einsatz anderer Rezipientenstämme (z.B. *K.pneumoniae* RC 23, *K.pneumoniae* KAY 2026, *E.coli* RR 28, *E.coli* JM 105) brachte keine Verbesserung der Sekretion von CGT. Wurde Minimalmedium zur

Anzucht verwendet, konnte im Kulturüberstand überhaupt keine Aktivität nachgewiesen werden. Erfolgte die Kultivierung mit dem Induktor IPTG über einen längeren Zeitraum (12-16 h) konnte eine Enzymaktivität von ca. 1 Einheit/ml, was einer Konzentration des Enzyms vom 5 mg/ml Kulturüberstand entspricht, gemessen werden. Allerdings war in diesen Kulturen die gesteigerte Enzymmenge im Überstand offensichtlich auf eine Lyse der Zellen zurückzuführen. Die Veränderung der Induktionsbedingungen (Induktion nach Kultivierung der Stämme bis zur stationären Phase, Reduktion der Konzentration an IPTG) hatte keine Steigerung der extrazellulären Enzymmenge zur Folge.

b. Induktion mit Lactose

Für die Überexpression von Genen, die unter Kontrolle des lac- bzw. des davon abgeleiteten tac-Promotors stehen, wird in großtechnischem Maßstab, vor allem aus Kostengründen, häufig Lactose statt IPTG zur Inaktivierung des lac-Repressors verwendet (P. Buckel, persönliche Mitteilung).

Aus diesem Grund wurden für die konstruierten tac-cgt-Fusionen Expressionsexperimente unter Verwendung von Lactose als Induktor durchgeführt.

Als erstes wurde die Bildung cgt-spezifischer mRNA in Abhängigkeit von Lactose im Kulturmedium mit Hilfe eines sog. "northern blot"-Experiments untersucht.

Dazu wurden die Stämme E.coli DS 410 (pCM 705) und K.pneumoniae RC 10 (pCM 703), in LB-Medium, das neben Tetrazyklin 1 % Lactose enthielt, bei 37°C bis zu einer O.D.₄₂₀ von 1.0 angezogen. Als Kontrolle wurde jeweils eine Kultur ohne Lactose mitgeführt. Aus den Zellen wurde RNS isoliert, nach Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel auf einen "gene-screen"-Filter übertragen und mit einem durch ³²Phosphat markierten DNS-Fragment, das das cgt-Strukturgen enthielt (siehe Kapitel C.V.), hybridisiert.

Wie aus Abbildung 24 zu sehen ist, wird cgt-spezifische mRNA bei Induktion mit Lactose in wesentlich erhöhter Menge als unter nicht-induzierenden Bedingungen gebildet. Die Bildung von Trans-

kript erfolgt durch *K.pneumoniae* RC 10 in erheblich stärkerem Maß als durch *E.coli* DS 410. Im Fall von *E.coli* DS 410 (pCM 703) ist auch unter nicht induzierenden Bedingungen cgt-spezifische mRNA nachzuweisen, was, wie bereits in anderen Induktionsexperimenten gezeigt (Abbildung 22), offenbar auf eine unvollständige Repression des tac-Promotors zurückzuführen ist. Die ebenfalls zu beobachtenden Hybridisierungssignale im Bereich niedrigeren Molekulargewichts sind möglicherweise auf einen Abbau der mRNA zurückzuführen.



Abbildung 24:

"Northern blot"-Experiment zum Nachweis cgt-spezifischer mRNA aus 1: *E.coli* DS 410 (pCM 703) nach Kultivierung mit 1 % Lactose, 2: *E.coli* DS 410 (pCM 703) nach Kultivierung ohne Induktor, 3: *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) nach Kultivierung ohne Induktor, 4: *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) nach Kultivierung mit 1 % Lactose.

Um die über den tac-Promotor gesteuerte Expression des cgt-Strukturgens durch die verschiedenen tac-cgt-Fusionsplasmide sowie die Sekretion der gebildeten CGT vergleichen zu können, wurden Induktionsexperimente unter Verwendung von Lactose durchgeführt. Als Rezipienten wurden *E.coli* DS 410 und *K.pneumoniae* RC 10 verwendet.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Abbildung 25:

Immunoblot-Experiment zur Untersuchung der Expression des cgt-Strukturgens bei Induktion mit Lactose durch 1: E.coli DS 410 (pCM 702), 2: K.pneumoniae RC 10 (pCM 702), 3: E.coli DS 410 (pCM 700), 4: K.pneumoniae RC 10 (pCM 700), 5: E.coli DS 410 (pCM 704), 6: K.pneumoniae RC 10 (pCM 704), 7: E.coli DS 410 (pCM 703), 8: K.pneumoniae RC 10 (pCM 703), 9: E.coli DS 410 (pCM 803), 10: K.pneumoniae RC 10 (pCM 803).
Aufgetrennt wurden jeweils 40 µl Kultur bei gleicher Zelldichte.

Die Stämme wurden in LB-Medium mit Tetrazyklin und 1 % Lactose 18 h lang bei 37°C kultiviert. Unter diesen Bedingungen war keine Lyse der Zellen zu beobachten. Jeweils 40 µl der Kulturen (Zellen plus Überstand) wurden nach SDS-PAGE in einem 12.5 % Polyacrylamidgel einem Immunoblot-Experiment unterzogen.

Wie Abbildung 25 zeigt, sind zwischen den einzelnen Kulturen erhebliche Unterschiede in der Menge der gebildeten CGT zu beobachten. Daraus ist zu schließen, daß die durch Lactose induzierte Expression des cgt-Strukturgens in hohem Maß von der Region zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und Initiationskodon abhängt. Im Falle von *K.pneumoniae* RC 10 geht mit der Verkürzung des Abstands eine Steigerung der CGT-Synthese einher. Dagegen ist, bei Induktion mit Lactose, die Expression des cgt-Strukturgens durch *E.coli* DS 410 offensichtlich nicht nur von der Länge, sondern auch von der Nukleotidsequenz dieser Region abhängig.

Um die Menge des ins Medium sezernierten Enzyms zu bestimmen, wurde die CGT-Aktivität der Kulturüberstände bestimmt.

Tabelle 7: CGT-Aktivität im Kulturüberstand nach Induktion des tac-Promotors mit Lactose

Plasmid	CGT-Aktivität (Einheiten/ml)	
	<i>E.coli</i> D 410	<i>K.pneumoniae</i> RC 10
pCM 702	0.5	0.1
pCM 700	7.9	0.5
pCM 704	0.1	4.5
pCM 703	2.7	4.9
pCM 803	0.1	4.9

Die in Tabelle 7 aufgeführten Werte lassen folgende Schlüsse zu.

-CGT wird nach Induktion mit Lactose in erheblich höherem Maß sezerniert als nach Induktion mit IPTG (siehe Kapitel VII.2.a.).

-Im Fall von *K.pneumoniae* RC 10 wird der Export von CGT bei Verkürzung des Abstands zwischen Ribosomenbindungsstelle und Initiationskodon von 17 auf 15 bzw. 13 Nukleotide drastisch verbessert. Eine weitere Verkürzung hat jedoch keine Steigerung der Sekretion zur Folge. Offensichtlich wird in der Exportkapazität ein Niveau erreicht, daß nicht mehr überschritten werden kann.

-Für *E.coli* DS 410 kommt kein einheitliches Bild zustande. Die Menge an sezerniertem Enzym variiert mit der Menge an gebildeter CGT (siehe Abbildung 25). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die CGT durch Destabilisierung der äußeren Membran, also nicht durch einen spezifischen Transportvorgang, in das Kulturmedium gelangt.

Um Aufschlüsse über die Frage zu bekommen, warum das überproduzierte Enzym nach Induktion mit Lactose in höherem Maß sezerniert wird als nach Induktion mit IPTG, wurde der in den Zellen zurückgehaltene Anteil an CGT untersucht.

Dazu wurde der Zellschlag aus Kulturen von *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) und *E.coli* DS 410 (pCM 703), die entweder durch IPTG (5 h lang) oder Lactose (16 h lang) induziert worden waren, in SDS-Applikationspuffer (Laemmli und Favre, 1973) zu einer Dichte von ca. 10^8 Zellen/ml aufgenommen und über ein Immunoblotting-Experiment untersucht. Das erhaltene Resultat (Abbildung 26) läßt sich in folgender Weise interpretieren:

-Die innerhalb der Zellhülle zurückgehaltene Menge an CGT ist, bezogen auf die Zelldichte, im Fall der mit IPTG induzierten Kulturen, höher als bei Kulturen, die mit Lactose als Induktor angezogen worden waren.

-Im Fall von *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) sind deutlich zwei mit Antikörpern reagierende Banden zu unterscheiden, von denen die rascher wandernde Bande mit aus dem Kulturfiltrat von *K.pneumoniae* M5a1 gereinigter CGT komigriert. Dabei könnte es sich um reife, bereits durch die Cytoplasmamembran transportierte CGT handeln, die im Periplasma zurückgehalten wird. Die zweite Bande besteht, nach dem Laufverhalten zu schließen, möglicherweise aus Vorläuferprotein.

1 2 3 4 5 4 5

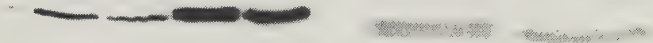


Abbildung 26:

Immunoblot-Experiment zur Untersuchung der innerhalb der Zellhülle zurückgehaltenen CGT.

1: Gereinigte CGT, 2: Zellsediment von *E.coli* DS 410 (pCM 703) nach Induktion durch IPTG, 3: Zellsediment von *E.coli* DS 410 (pCM 703) nach Induktion durch Lactose, 4: Zellsediment von *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) nach Induktion durch IPTG, 5: Zellsediment von *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 703) nach Induktion durch Lactose. In allen Spuren wurde jeweils Lysat von 10^6 Zellen aufgetragen.

IX. Veränderung der Signalsequenz der CGT

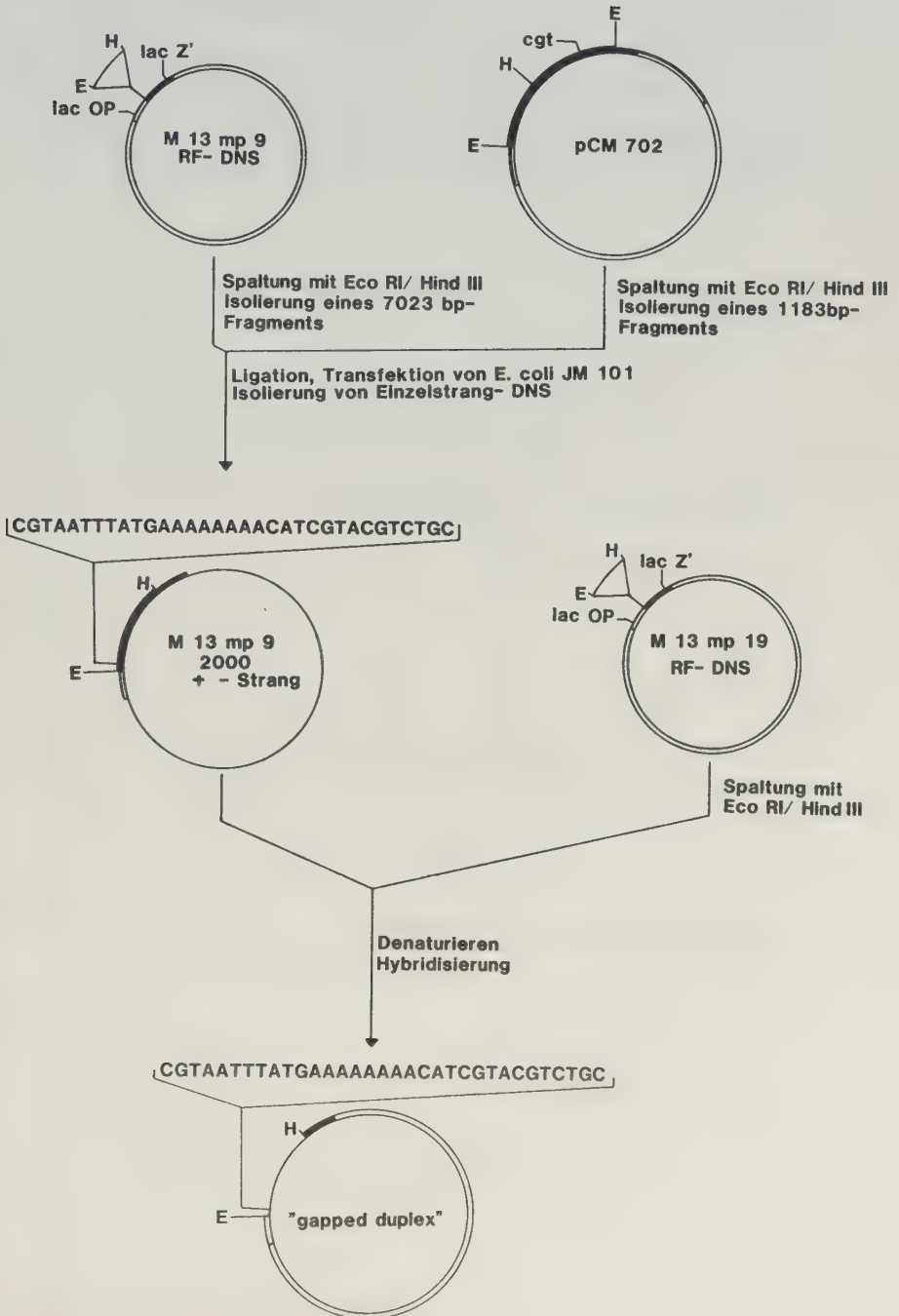
Eine Möglichkeit den Export der Überproduzierten CGT zu verbessern, liegt in einer Veränderung der Signalsequenz. Wie in Abbildung 15 gezeigt, enthält das Signalpeptid der CGT einen Cysteinrest. Ein anderes, von *K.pneumoniae* in das Kulturmedium sezerniertes Protein, die Pullulanase, enthält im aminoterminalen Bereich ebenfalls einen Cysteinrest (Pugsley et al., 1986). Dieses Enzym wird über eine Lipoprotein-Vorstufe, bei der ein Fettsäurerest an die Sulphydryl-Gruppe des Cysteins gebunden vorliegt, sezerniert. Es bestand daher die Möglichkeit, daß CGT über eine ähnliche Zwischenstufe sezerniert wird. Das für Cys kodierende Triplett wurde deswegen gegen ein Kodon für Ala ersetzt, um die Bildung einer möglichen Zwischenstufe beim Export zu umgehen und dadurch die Sekretion zu beschleunigen.

Zu diesem Zweck wurde nach Restriktionsspaltung des Plasmids pCM 702 ein 1.18 kb Eco RI/Hind III-Fragment isoliert und mit der durch die gleichen Restriktionsenzyme gespaltenen doppelsträngigen DNS des M 13 Phagen mp 9 ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurde *E.coli* JM 101 (supE44) transfiziert. Aus den Plaques wurde einzelsträngige DNS isoliert. Doppelsträngige DNS des Phagen M13 mp 19 wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten, hitzedenaturiert und zusammen mit der rekombinanten einzelsträngigen DNS renaturiert (Abbildung 27).

Mit der dadurch entstandenen "gapped duplex"-DNS wurde ein 33-meres Oligonukleotid, das statt dem für Cys kodierenden Triplett UGU ein Kodon für Ala (GCU) enthielt, hybridisiert (Abbildung 28).

In der Hybrid-DNS lagen zwei Fehlpaarungen vor. Die verbleibenden Lücken wurden mit Hilfe von DNS-Polymerase und Protein 32 des Phagen T4 sowie *E.coli* DNS-Ligase aufgefüllt. Mit diesem Ansatz wurden Zellen des Reparatur-defizienten Stammes BMH 71-13 mutS transfiziert. Mit den in der Kultur gebildeten Phagen wurde eine Infektion von *E.coli* JM 105, einem Suppressor freien Stamm, durchgeführt (Abbildung 27).

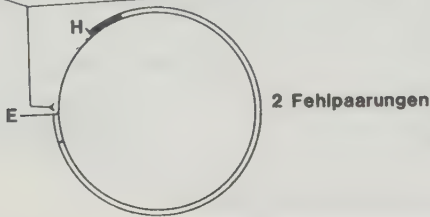
Abbildung 27: Legende: Siehe übernächste Seite



"gapped duplex" 5' GCATTAAATAC TTT TTTT TTTT GCTAGCATGCAGACG 3'
33mer Oligonukleotid

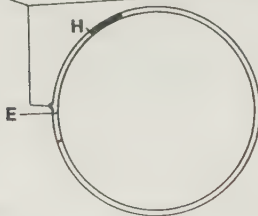
Hybridisierung

GC
GCATTAAATAC TTT TTTT TAGCATGCAGACG
CGTAATTTATGAAAAAAAACATCGTACGTCTGC



Auffüllen der Lücken mit dNTP
durch T4- DNS- Polymerase, E. coli- Ligase

GC
GCATTAAATAC TTT TTTT TAGCATGCAGACG
CGTAATTTATGAAAAAAAACATCGTACGTCTGC



Transfektion von E. coli BMH 71/18 mut S

Infektion von E. coli JM 105

GCATTAAATAC TTT TTTT TTTT GCTAGCATGCAGACG
CGTAATTTATGAAAAAAAACGATCGTACGTCTGC

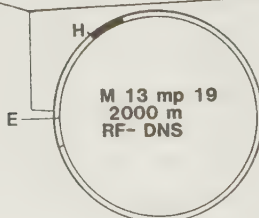


Abbildung 27:

Oligonukleotid-Mutagenese zur Veränderung der CGT-Signalsequenz. Einzelsträngige DNS ist durch einen Kreis, doppelsträngige DNS durch einen Doppelkreis gekennzeichnet. Abkürzungen: lacZ': Aminoterminaler Teil des für β -Galactosidase kodierenden Gens, lacOP: lac-Promotor und -Operator, RF: Replikative Form (doppelsträngig); E: Eco RI, H: Hind III.

Aus den Klonen wurde einzelsträngige DNS isoliert und über Sequenzansätze (T-Tracking) untersucht. Von zehn getesteten wiesen fünf Klone das durch die Mutagenese vom Wildtyp abweichende Muster auf. Von zwei Mutanten wurde die Nukleotidsequenz des die Mutation umfassenden Bereichs mit Hilfe der Kettenabbruchmethode bestimmt. In beiden Fällen wurde das Vorhandensein der Mutationen bestätigt.

Die Rückklonierung des mutierten Fragments wurde über eine 3-Komponenten-Ligation durchgeführt (Abbildung 28): Dazu wurde nach Restriktionsspaltung von RF-DNS aus mutierten Klonen ein 253 bp Eco RI/Bgl II-Fragment isoliert, das die beiden Punktmutationen enthielt. Das tac-cgt-Fusionsplasmid pCM 702 wurde mit Eco RI/Pvu I gespalten und ein 5.377 kb Fragment mit den Genen für lac-Repressor und Tc-Resistenz sowie dem tac-Promotor isoliert. In einem weiteren Ansatz wurde das Plasmid pCM 702 mit Bgl II und Pvu I gespalten; ein 2.803 kb Fragment mit dem carboxyterminalen Anteil des cgt-Gens und dem Terminator wurde isoliert. Die drei DNS-Fragmente wurden ligiert und mit dem Ligationsansatz E.coli JM 101 transformiert; die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit Tetrazyklin und Ampicillin. Aus resistenten Klonen wurde Plasmid-DNS isoliert. Die Prüfung, ob die Plasmide das richtige (mutierte) DNS-Fragment enthielten, wurde durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Nhe I, deren Erkennungssequenz durch die Mutagenese erst erzeugt worden war, durchgeführt. Klone, die das mutierte Plasmid trugen, wiesen im Gegensatz zum Wildtyp-Plasmid eine Nhe I- Schnittstelle auf. Das mutierte Plasmid wurde mit pCM 2000 bezeichnet.

Abbildung 28: Legende: Siehe nächste Seite

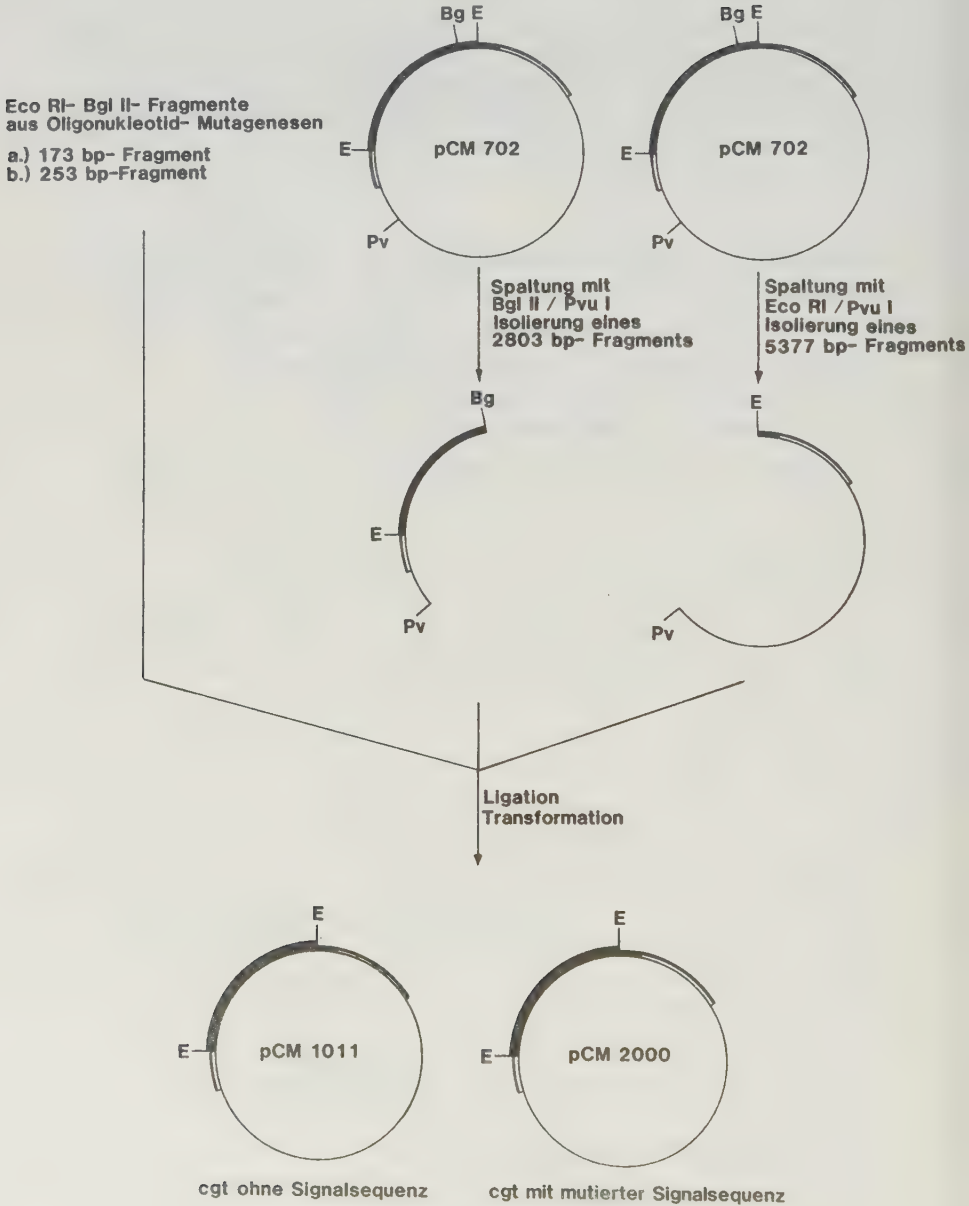


Abbildung 28:

Rückklonierung der aus Oligonukleotid-Mutagenesen erhaltenen Eco RI-Bgl II-Fragmente in pCM 702.

Abkürzungen siehe Abbildungen 18, 19, 20.

a. Signalsequenz deletiert

b. Signalsequenz mutiert (Cys→Ala)

Der Einfluß der Mutation (Cys→Ala) auf den Export wurde nach Transformation von *K.pneumoniae* RC 10 und *E.coli* DS 410 mit pCM 2000 im Vergleich zu pCM 702 getestet:

-Parallelausstriche der Klone wurden auf LB-Platten mit 0.5 % Amylopektin-Azur einerseits und LB-Platten mit 0.5 % Amylopektin-Azur und 1 mM IPTG zur Induktion andererseits angefertigt und 24 h bei 37°C bebrütet (Abbildung 29).

-Die Stämme wurden über Nacht in LB-Medium mit 1 % Lactose zur Induktion kultiviert. Die CGT-Aktivität im Kulturüberstand wurde bestimmt.

In allen Fällen konnten keine Unterschiede der Exportierbarkeit zwischen der durch pCM 2000 und durch pCM 702 kodierten CGT festgestellt werden (Abbildungen 29, 30).

Die Aktivität der durch DS 410 (pCM 2000) ebenso wie die der durch DS 410 (pCM 702) sezernierten CGT betrug ca. 0.5 Einheiten/ml. Im Fall von RC 10 (pCM 2000) lag die Aktivität ebenso wie von RC 10 (pCM 702) bei 0.05 Einheiten/ml.

Aus den Resultaten kann geschlossen werden, daß die Umwandlung von Cystein in Alanin im Signalpeptid keine Veränderung der Sezernierbarkeit der CGT nach sich zieht.

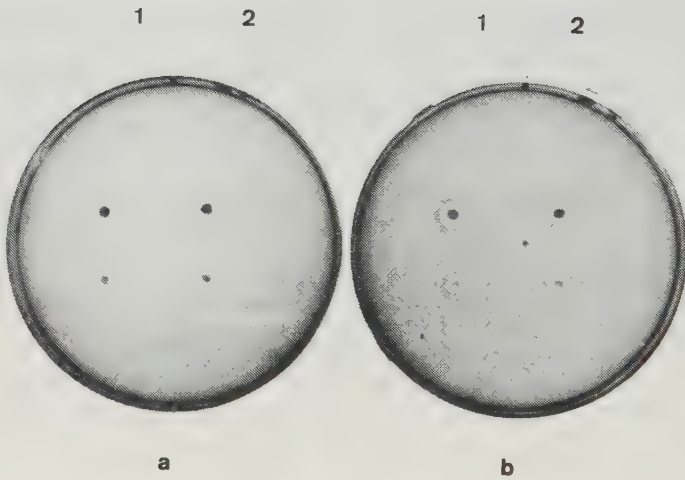


Abbildung 29:

Stärkehydrolyse nach Veränderung der Signalsequenz der CGT unter induzierenden bzw. nicht-induzierenden Bedingungen.

a: LB mit 0.5 % Amylopektin-Azur, 20 µg/ml Tc; b: LB mit 0.5 % Amylopektin-Azur, 20 µg/ml Tc, 1 mM IPTG; obere Reihe: *K.pneumoniae* RC 10; untere Reihe: *E.coli* DS 410; 1: pCM 2000, 2: pCM 702.

X. Expression von cgt ohne Signalsequenz

Um die beim Export von überproduzierter CGT auftretenden Probleme zu umgehen, wurde versucht, eine intrazelluläre Überproduktion des Enzyms zu erreichen. Ziel des Ansatzes war, CGT in der Zelle auf eine Konzentration anzureichern, die einen direkten Einsatz des Zellrohextrakts zur Produktion von Cyclodextrinen aus Stärke ermöglichen würde. Dazu mußte die für das Signalpeptid der CGT kodierende Nukleotidsequenz deletiert und mit Hilfe von Oligonukleotid-Mutagenese ein Initiationskodon vor die für die reife CGT kodierende Sequenz plaziert werden.

1. Konstruktionen eines tac-cgt-Expressionsplasמידs ohne cgt-Signalsequenz

Die Konstruktion wurde mit Hilfe der sog. Reparatur-Synthesemethode nach dem in Abbildung 30 aufgeführten Schema durchgeführt. Das cgt-Strukturgen weist in der für das Signalpeptid kodierenden DNS-Sequenz eine Sph I-Spaltstelle sowie innerhalb des ersten Drittels des Strukturgens jeweils eine Eco RV- und eine Bgl II-Schnittstelle auf. Diese Restriktionsenzyme wurden zur Konstruktion eines tac-cgt-Fusionsplasמידs ohne cgt-Signalsequenz verwendet.

Aus dem tac-cgt-Fusionsplasmid pCM 702 (Abbildung 19) wurde nach Restriktionsspaltung ein 282 bp langes Sph I-Eco RV-Fragment isoliert.

Nach Zugabe eines 30-meren Oligonukleotids, das vor dem für den Aminoterminal der reifen CGT kodierenden Bereich ein Initiationskodon und eine Spaltsequenz für Eco RI enthielt, wurde der Ansatz durch Hitzeeinwirkung denaturiert und anschließend schockgefroren. Die Anlagerung des Oligonukleotids an die komplementäre, einzelsträngige DNS erfolgte während der Renaturierung durch langsames Erwärmen. Anschließend wurde der eigentliche Mutageneseschritt durch Abbau- und Auffüllreaktionen mit Hilfe der DNS-Polymerase und des Proteins 32 des T4-Phagen in Anwesenheit von dNTP durchgeführt. Die auf diese Weise erhaltenen Reaktionsprodukte wurden mit Eco RI und Bgl II nachgespalten.

Abbildung 30: Legende: Siehe nächste Seite

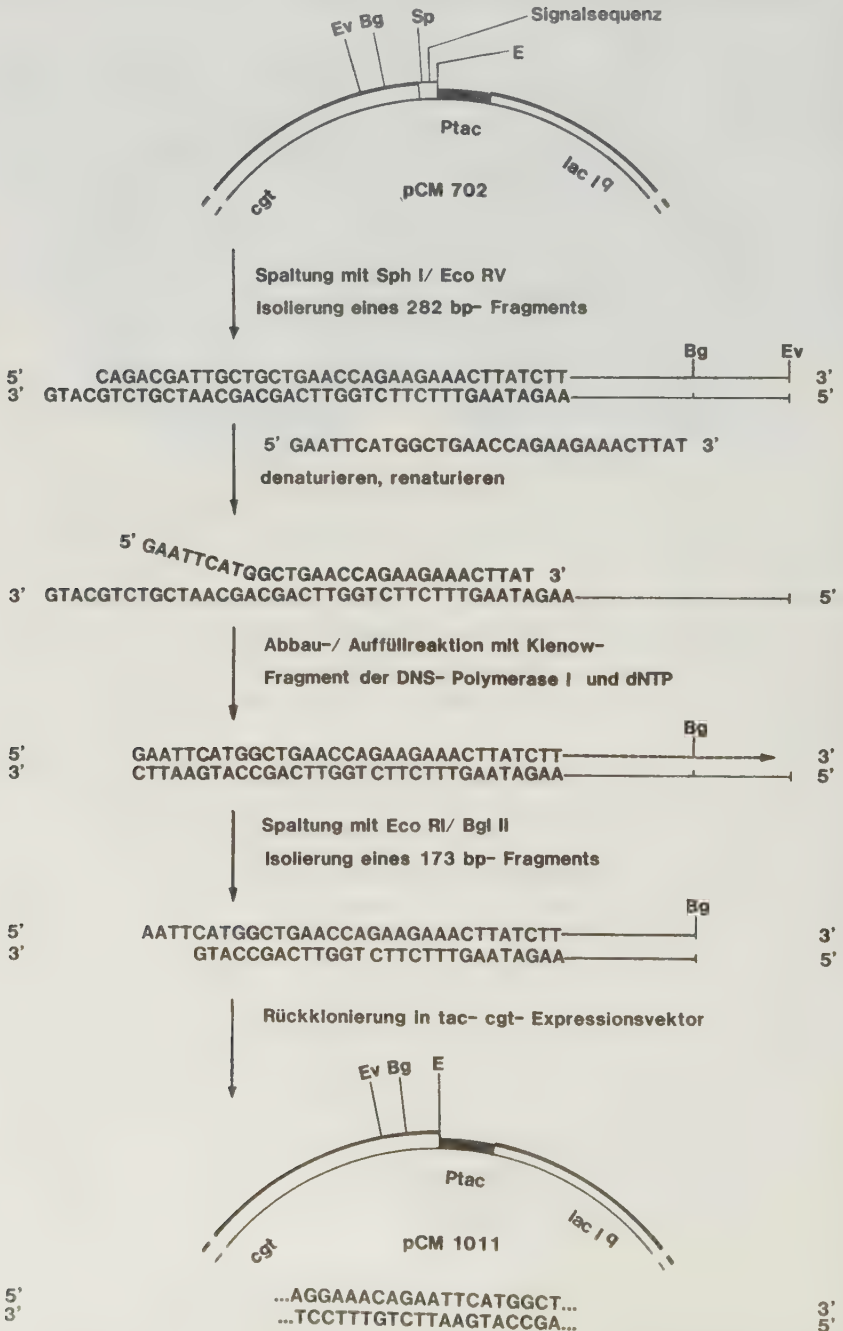


Abbildung 30:

Konstruktion einer tac-cgt-Translationsfusion ohne cgt-Signalsequenz.

Abkürzungen: Bg: Bgl II, E: Eco RI, Ev: Eco RV. Die Plasmide pCM 702 und pCM 1011 sind nur in dem für die Konstruktion relevanten Bereich gezeigt; alle anderen Plasmidabschnitte sind aus Abbildung 18 zu entnehmen. Expressionssignale sind wie in den Abbildungen 17-20 hervorgehoben.

Ein 173 bp langes Eco RI-Bgl II-Fragment wurde isoliert und zur Rückklonierung in den Expressionsvektor pCM 702 verwendet (Abbildung 28). Auf diese Weise wurde die für das Signalpeptid der CGT kodierende Basenfolge des Plasmids pCM 702 deletiert. Mit dem Ansatz wurden Zellen von E.coli HB 101 transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit 20 µg/ml Tetrazyklin. Aus resistenten Klonen wurde Plasmid-DNS isoliert und einer Spaltung mit der Restriktionsendonuklease SphI unterzogen. Unter 71 getesteten Plasmiden hatte eines die Sph I Spaltstelle verloren, wie für das tac-cgt-Fusionsplasmid ohne cgt-Signalsequenz zu fordern war. Der Übergangsbereich von tac-Promotor und Initiationskodon wurde durch Bestimmung der Nukleotidsequenz überprüft und entsprach dem für die Konstruktion vorhergesagten (Abbildung 30). Durch Restriktionskartierung wurde das Vorhandensein aller weiteren geforderten Merkmale bestimmt (cgt-Strukturgen, Polylinker, Terminator, Resistenzen gegen Ampicillin und Tetrazyklin. Die Ribosomenbindungsstelle wird wie bei den Translationsfusionen vom tac-Vektor gestellt, das durch Oligonukleotid-Mutagenese entstandene Initiationskodon liegt unmittelbar vor dem aminoterminalen Alaninrest. Die durch die Konstruktion erzeugte CGT ist demnach um eine Aminosäure gegenüber der aus dem Kulturfiltrat von K.pneumoniae gewonnenen verlängert. Das Plasmid wurde mit pCM 1011 bezeichnet.

2. Expressionsexperimente

Die Expression des cgt-Strukturgens ohne Signalsequenz wurde untersucht.

Dazu wurde Stamm E.coli HB 101 (pCM 1011) in LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin bei 37°C bis zu einer O.D.₅₀₀ von 0.5 angezogen und nach Zugabe von IPTG auf eine Konzentration von 1 mM 5 h lang weiterinkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellen in 1/10 des Ausgangsvolumens CGT-Puffer (30 mM Tris/Cl pH 7.2, 5 mM CaCl₂) aufgenommen und in einer French Presse bei 110 MPa aufgebrochen. Die Enzymaktivität des so erhaltenen Rohextrakts wurde mit ca. 3 Einheiten/ml bestimmt, was einer Aktivität von ca. 0.3 Einheiten/ml Kultur gleichkam. Dieser Wert entsprach einer Konzentration von 1.5 µg/ml von aus dem Kulturfiltrat von K.pneumoniae M5a1 gewonnener CGT und blieb damit weit hinter den Erwartungen zurück.

Bei mikroskopischer Untersuchung von Zellen aus den Induktionsansatz wurden intrazelluläre, lichtbrechende Körperchen sichtbar (Abbildung 31a). Dieser Befund legte die Vermutung nahe, daß CGT bei intrazellulärer Überproduktion von der Zelle in Form enzymatisch inaktiver Einschlußkörperchen, sog. "inclusion bodies" eingelagert wird, ein Phänomen, das bereits von mehreren anderen, in E.coli überproduzierte Proteinen berichtet wurde (Marston et al., 1984; Winkler et al., 1985; Schoner et al., 1985; Muraki et al., 1986; O'Neill et al., 1986).

Das Auftreten der lichtbrechenden Körperchen wurde auch bei Zellen des Stammes K.pneumoniae RC 10, die mit dem Plasmid pCM 1011 transformiert waren, nach Induktion des tac-Promotors mit IPTG beobachtet (Abbildung 31b). Das gleiche Ergebnis wurde auch bei Verwendung von Lactose als Induktor erzielt.



Abbildung 31:

Bildung von Einschlußkörperchen durch *E.coli* HB 101 (pCM 1011) und *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 1011) nach Induktion mit IPTG. a: *E.coli* HB 101 (pCM 1011); b: *K.pneumoniae* RC 10 (pCM 1011).

3. Experimente zur Regeneration der CGT-Aktivität

Marston et al., (1984) beschreiben eine Methode, nach der als inaktive Einschlußkörperchen vorliegende Proteine durch Denaturierung in Lösung gebracht und nach anschließender Renaturierung zumindest teilweise in ihre biologisch aktive Form zurückgeführt werden können.

Ein entsprechendes Experiment wurde auch mit intrazellulär überproduzierter CGT durchgeführt.

Dazu wurde der E.coli-Stamm MM 294, der sich zur Expression von Genen mit Hilfe des tac-Promotors besonders eignet (P. Heinrich, pers. Mitteilung), mit dem Plasmid pCM 1011 transformiert und im Fermentermaßstab (8 l) auf CGT-Überproduktion getestet. Die Zellen wurden in LB-Medium mit 5 mM CaCl_2 und 200 $\mu\text{g/ml}$ Amp, das zur Induktion des tac-Promotors 1 % Lactose enthielt, bis zur stationären Wachstumsphase angezogen (Belüftung: 1.8 vvm, Rührgeschwindigkeit: 150 Upm). Nach Erreichen der stationären Phase ($\text{O.D.}_{420} = 6.0$) wurden die Zellen mit Hilfe einer Westphalia-Durchlaufzentrifuge geerntet. Die Ausbeute betrug 42 g Naßgewicht.

Die weiteren Schritte wurden nach dem in Abbildung 32 aufgeführten Schema durchgeführt.

Die Zellen wurden in einem Vol. CGT-Puffer (30 mM Tris/Cl pH 7.2, 5 mM CaCl_2) suspendiert, mit RNase und DNase zu einer Konzentration von je 25 $\mu\text{g/ml}$ versetzt und mit Hilfe einen French Presse bei 110 MPa aufgebrochen. Der auf diese Weise erhaltene Rohextrakt wurde 30 min bei 30.000 x g zentrifugiert (Sorvall Superspeed RC 5B, SS 34). Der Niederschlag wurde im Ausgangsvolumen CGT-Puffer resuspendiert, anschließend mit 7 Vol. Waschpuffer (50 mM Tris/Cl; pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.5 % v/v Triton X-100) verdünnt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals 30 min bei 30.000 x g zentrifugiert. Der gewaschene Niederschlag wurde in 10 ml/g Naßgewicht Lösungspuffer (50 mM Tris/Cl; pH 8.0; 50 mM NaCl; 8 M Harnstoff) aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 9 Vol. Renaturierungspuffer (50 mM KH_2PO_4 ; pH 10.0; 50 mM NaCl; 5 mM CaCl_2) zugegeben, der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur

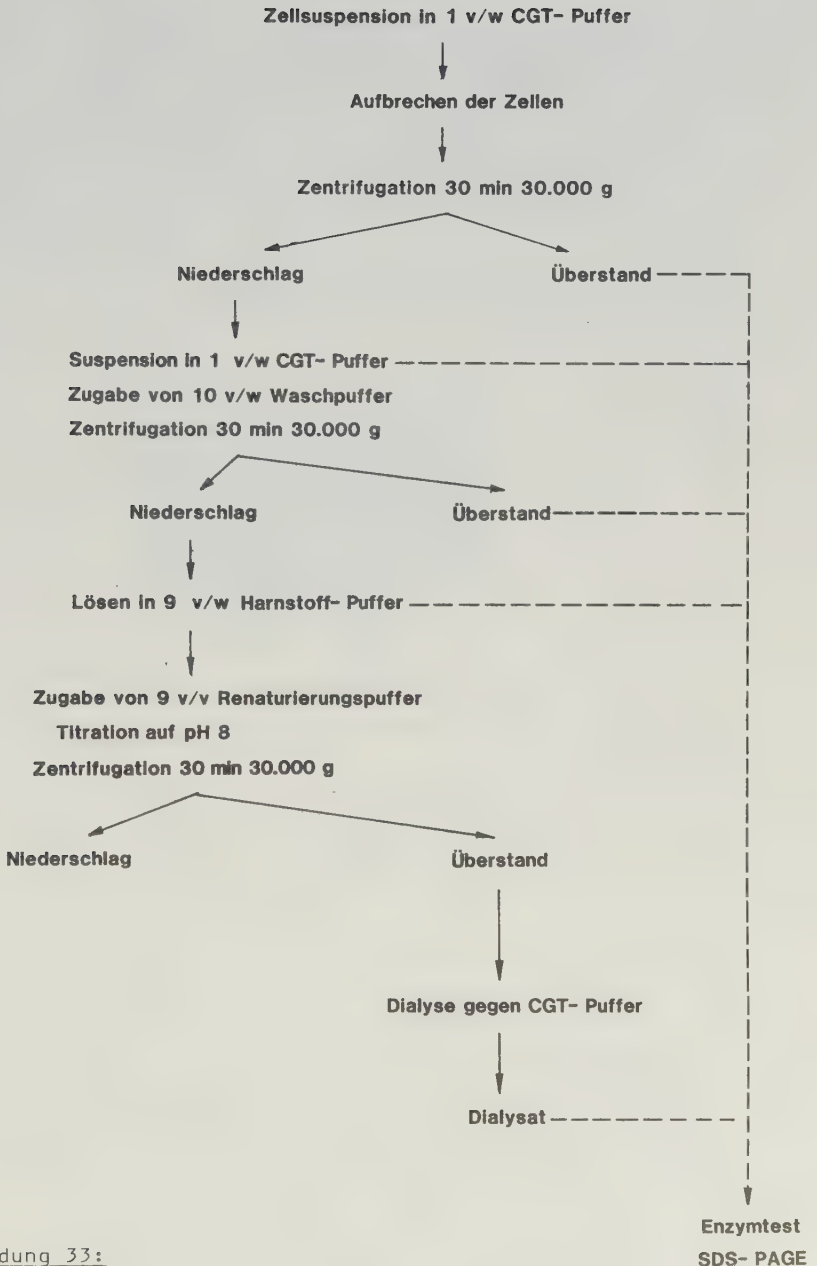


Abbildung 33:

Solubilisierung der als Einschlusskörperchen vorliegenden CGT und partielle Regeneration der CGT-Aktivität.

weiterinkubiert und dann mit HCl auf einen pH von 8.0 titriert. Nach weiterer einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde unlösliches Material 30 min lang bei 30.000 x g abzentrifugiert und der Überstand über Nacht gegen 5 l CGT-Puffer dialysiert. Die CGT-Aktivität der durch die einzelnen Schritte erhaltenen Fraktionen wurde bestimmt und die Menge der gebildeten CGT nach Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE in einem 12.5 % Gel und Färbung mit Coomassie-Blau abgeschätzt. Die Resultate des Experiments sind in Abbildung 33 und Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Aktivität der während Solubilisierung und Renaturierung von CGT aus Einschußkörperchen erhaltenen Fraktionen (jeweils bezogen auf 1 ml Kultur).

Fraktion	CGT-Aktivität (Einheiten/ml Kultur)
S 30-Überstand	0.13
S 30-Niederschlag	0.00
Waschlösung	0.00
S 30-Niederschlag nach Lösen in Harnstoffpuffer	0.00
S 30-Niederschlag nach Lösen in Harnstoffpuffer, Verdünnung in Renaturie- rungspuffer und Dialyse	0.06

Danach besteht offensichtlich die Möglichkeit, die intrazellulär als Einschußkörperchen ausgefällte CGT unter denaturierenden Bedingungen quantitativ in Lösung zu bringen. Die CGT kann, zumindest teilweise, in ihre biologisch aktive Form zurückgeführt werden. Das Verfahren ist jedoch zu aufwendig, um in großem Maßstab angewandt zu werden, und wurde deshalb nicht weiterverfolgt.

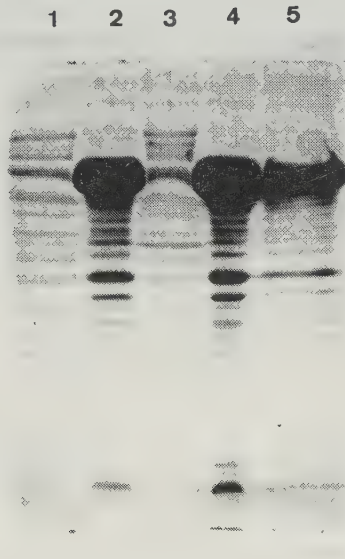


Abbildung 33:

Gelelektrophoretische Auftrennung von während Solubilisierung und Renaturierung von CGT aus Einschußkörperchen erhaltenen Proteinfraktionen.

1: S30-Überstand, 2: S30-Niederschlag, 3: Waschlösung, 4: S30-Niederschlag nach Solubilisierung mit Harnstoff, 5: S30-Niederschlag nach Solubilisierung, Verdünnung in Renaturierungspuffer und Dialyse.

XI. Expression des cgt-Strukturgens in B.subtilis

Zur Produktion von sezernierten Proteinen werden in der Regel gram-positive Mikroorganismen, z.B. Bacillus-Stämme, gram-negativen Bakterien vorgezogen, weil sie sich aufgrund der Struktur ihrer Zellhülle besser zur Sekretion eignen (Holland et al., 1986). Yamazaki et al. (1983) beschreiben z.B. einen B.subtilis-Stamm, der α -Amylase in einer Menge von 10-20 % des Gesamtproteins in das Kulturmedium ausschleusen kann.

Um bessere Sekretionsausbeuten als bei Verwendung von E.coli- bzw. K.pneumoniae-Stämmen zu erzielen, wurde das cgt-Strukturgen mit Hilfe eines geeigneten Expressionsvektors (pSI 1; Yansura und Henner, 1984; Abbildung 34) in einem B.subtilis-Stamm exprimiert. Die Expression des durch Fusion eines Promotors des lytischen B.subtilis-Bakteriophagen SP01 mit der Repressorbindestelle des E.coli-lac-Operons konstruierten Promotors, kann durch IPTG bzw. Lactose induziert werden. Ein lacI-Gen unter Kontrolle von Promotor und Ribosomenbindesequenz des Penicillinase-Gens von B.licheniformis steuert die Expression von klonierten Genen. Der Vektor vermittelt Cm-Resistenz und kann sowohl in B.subtilis als auch in E.coli repliziert werden.

Um das cgt-Gen in B.subtilis zu exprimieren, wurden spacI-cgt-Translationsfusionen konstruiert (Abbildungen 34, 35):

Das cgt-Strukturgen wurde nach Spaltung des Plasmids pCM 702 mit Eco RI auf einem 2078 bp Fragment isoliert. Der Vektor pSI 1 wurde durch Spaltung mit Xba I linearisiert. Glatte Enden wurden entweder durch Auffüllreaktionen mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNS-Polymerase I in Anwesenheit von dNTP oder durch die Abspaltung überstehender Enden mit Nuklease S1 geschaffen. Die so behandelten DNS-Fragmente wurden ligiert. Mit den Ansätzen wurden Protoplasten des Amylase defizienten B.subtilis-Stammes 1A297 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Platten mit DM 3-Regenerationsmedium und 5 µg/ml Chloramphenicol.

Abbildungen 34, 35:

Konstruktion von spacI-cgt-Translationsfusionen.

Abkürzungen: Pspac I: spac I-Promotor; cat: Strukturgen für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; ori 1: Startstelle für die Replikation in B. subtilis; X: Xba I; alle anderen Abkürzungen bzw. Hervorhebungen können den Legenden zu den Abbildungen 17-20 entnommen werden.

Abbildung 34: Legende: Siehe vorhergehende Seite

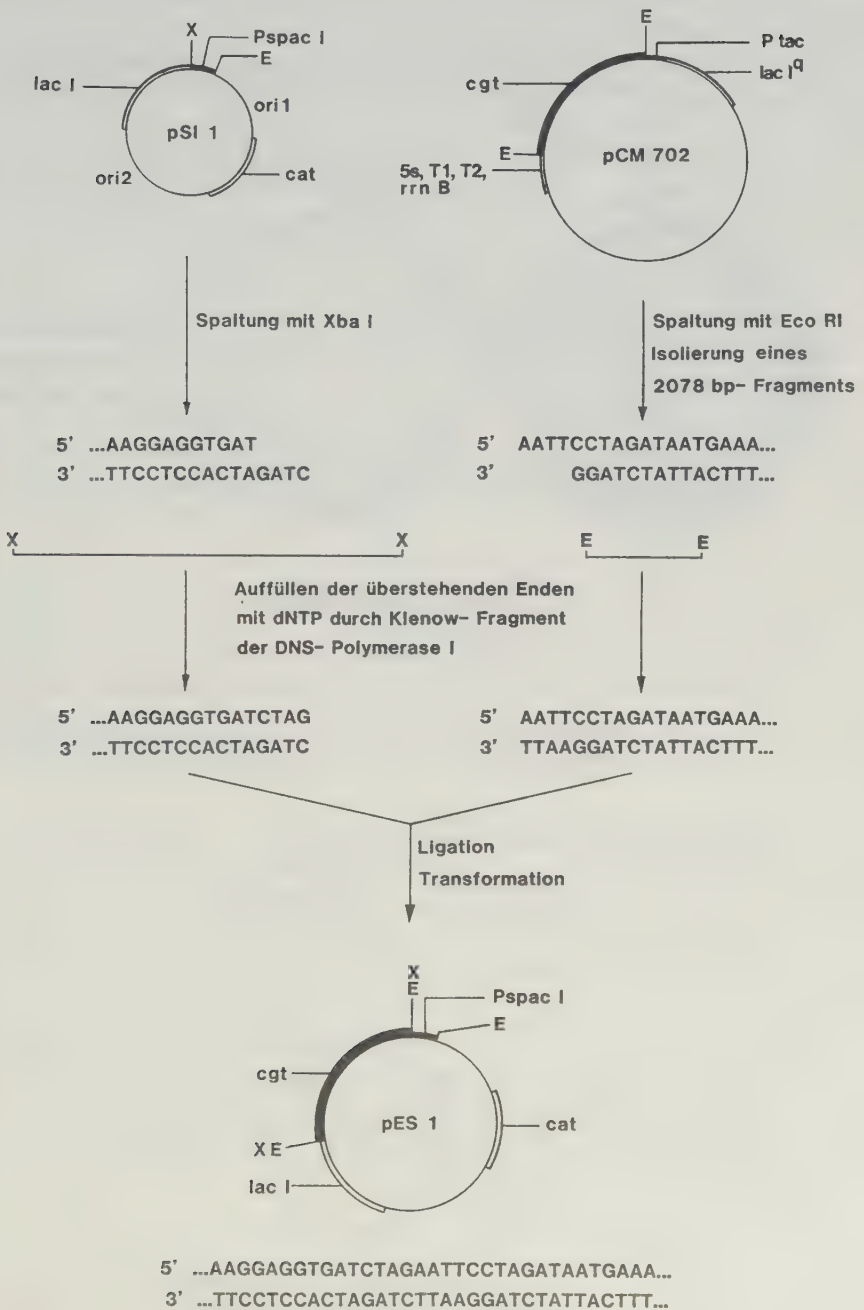
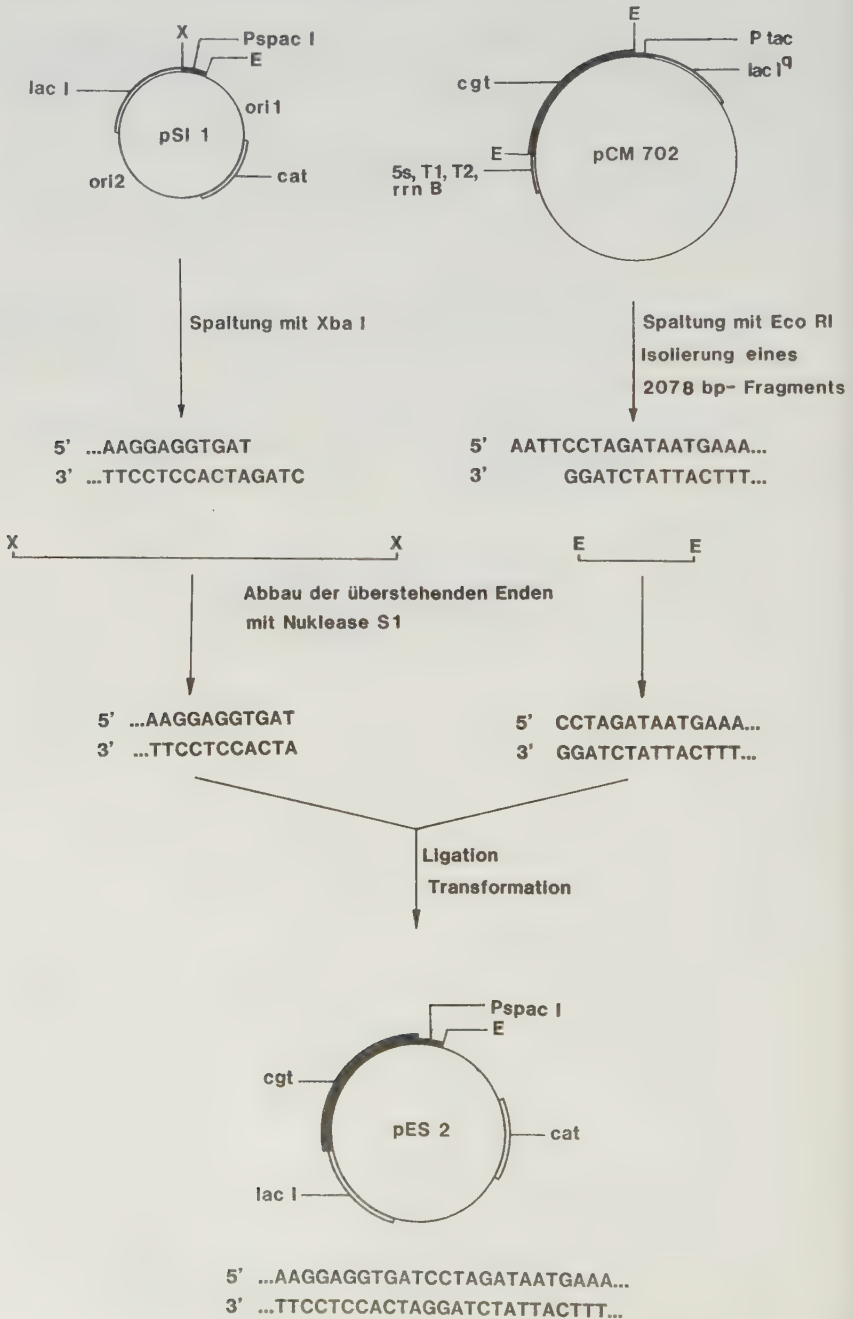


Abbildung 35: Legende: Siehe Abbildung 34



Die Expression des cgt-Strukturgens unter Kontrolle des *spacI*-Promotors wurde auf LB-Platten mit 0.5 % Amylopektin-Azur mit bzw. ohne IPTG nachgewiesen (Abbildung 36).

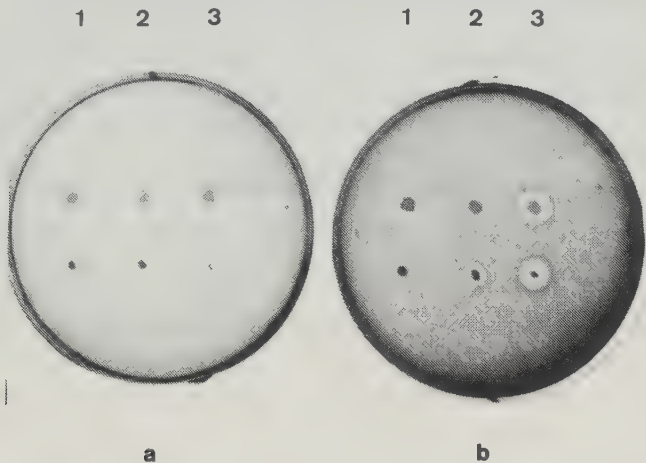


Abbildung 36:

Induktion der Expression von *spacI*-cgt-Translationsfusionen mit IPTG.

a: LB mit 0.5 % Amylopektin-Azur, 10 µg/ml Cm; b: LB mit 0.5 % Amylopektin-Azur, 10 µg/ml Cm, 1 mM IPTG;

obere Reihe: *E. coli* RR 28; untere Reihe: *B. subtilis* 1 A 297;

1: pSI 1, 2: pES 1, 3: pES 2.

Wie aus Abbildung 36 zu ersehen ist, waren sowohl *E. coli* RR 28 als auch *B. subtilis* 1A297 nach Transformation mit den Plasmiden pES 1 und 2 in der Lage, Hydrolysehöfe bei Induktion mit IPTG zu bilden. Die Verkürzung des Abstandes zwischen Ribosomenbindestelle und Initiationskodon zog eine Verbesserung der Expression nach sich.

Die Expression des cgt-Strukturgens blieb allerdings auf sehr niedrigem Niveau. Im Gegensatz zu den mit den *tac*-cgt-Fusionsvektoren transformierten Klonen mußte die Inkubation mit IPTG mindestens zwei Tage lang erfolgen, um Hydrolysehöfe beobachten zu können.

Die Nukleotidsequenz des Übergangsbereiches von *spacI*-Promotor und *cgt* wurde in gleicher Weise, wie für die *tac-cgt*-Fusionen beschrieben, bestimmt (Abbildung 37).

In beiden Fällen stimmte die sequenzierte Basenfolge mit der aus der Konstruktion geforderten überein (Abbildungen 34, 35).

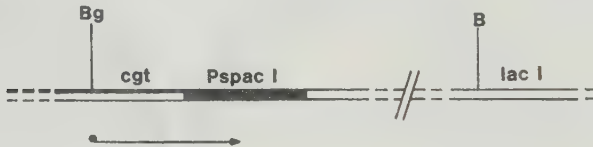


Abbildung 37:

Strategie zur Sequenzierung der *spacI*-*cgt*-Übergangsregion von Fusionsplasmiden.

Abkürzungen für Restriktionsschnittstellen: Bg: Bgl II; B: Bam HI. Der Pfeil gibt Richtung und Länge der jeweils bestimmten Nukleotidsequenz an. In beiden Fällen erfolgte 3'-Markierung des Bgl II-Endes.

Die Plasmide pES 1 und 2 zeigten eine bemerkenswerte Instabilität. Bei Anzucht - auch mit Chloramphenicol - wurden Bereiche der Plasmide, Teile des *cgt*-Strukturgens, Replikationsstartstellen oder Bereiche des Promotors, deletiert. Nach mehrmaliger Subkultivierung ging auch der Phänotyp "Stärkehydrolyse" verloren. Die Plasmide sind daher nicht zur Überexpression des *cgt*-Strukturgens, vor allen in Hinblick auf großtechnischen Einsatz, geeignet.

D. DISKUSSION

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Produktion der CGT von *K.pneumoniae* M5a1 unter technisch einfach zu kontrollierenden Bedingungen in möglichst großer Menge zu erreichen.

Dieses Ziel sollte mit Hilfe gentechnologischer Methoden durch Überexpression des *cgt*-Strukturgens in *K.pneumoniae* und anderen, nicht pathogenen Bakterienstämmen erreicht werden.

Vorbedingung für die gezielte Beeinflussung der CGT-Synthese war die genaue Kenntnis von Struktur und Expression des für das Enzym kodierenden Gens.

Die vorliegende Arbeit umfaßt daher mehrere Teilaspekte:

- Untersuchungen zur Regulation der CGT-Synthese,
- Klonierung des *cgt*-Strukturgens und Bestimmung seiner Nukleotidsequenz sowie der für die Expression verantwortlichen regulatorischen DNS-Abschnitte,
- Austausch der homologen gegen starke und einfach regulierbare externe Expressionssignale (Promotoren),
- Überexpression des *cgt*-Strukturgens in *K.pneumoniae*, *E.coli* und *B.subtilis*.

Darüberhinaus bot die Strukturaufklärung des *cgt*-Gens die Möglichkeit, die Sonderstellung von *K.pneumoniae* M5a1 als einzigem gram-negativem Bakterienstamm unter den CGT-Produzenten näher zu untersuchen und Primärstrukturvergleiche zu anderen Stärke-spaltenden Enzymen anzustellen.

I. Struktur und Expression des cgt-Gens von K.pneumoniae M5a1

1. Regulation der Expression des cgt-Strukturgens durch K.pneumoniae M5a1

Die Synthese von CGT durch K.pneumoniae M5a1 wird strikt reguliert. Aufgrund früher erhobener Befunde (Bender, 1977a; Binder, 1984) und der im Verlauf dieser Arbeit erzielten Resultate muß davon ausgegangen werden, daß die Regulation der Expression des cgt-Strukturgens in erster Linie über Katabolitrepresion erfolgt.

Diese Form der Regulation ist offensichtlich nicht nur bei Wachstum auf Glucose, sondern auch auf kurzkettigen, linearen Maltooligosacchariden (G_2 - G_6) wirksam, vermutlich, weil diese sehr schnell in die Zellen aufgenommen und dort rasch zu Glucose-Phosphaten abgebaut werden.

Die Teilhydrolyse von Stärke durch Säurebehandlung (Noredux N 150 B) führt offensichtlich zur Bildung kurzkettiger Maltooligosaccharide, deren Abbau eine partielle Hemmung der Expression des cgt-Strukturgens nach sich zieht.

Die Verwertung von Cyclodextrinen führt ebenfalls zur Unterdrückung der Genexpression, allerdings, im Vergleich zu linearen Maltooligosacchariden, wesentlich weniger intensiv. In diesem Fall kann die geringe Geschwindigkeit entweder von Aufnahme oder Ringspaltung für die geringe Intensität der Katabolitrepresion verantwortlich sein. Aufnahme und/oder Abbau von Cycloheptaamylose gehen, verglichen mit Cyclohexaamylose, offenbar langsamer vonstatten, was eine Hemmung der CGT-Synthese weiter verzögert. Die Regulation der Expression des cgt-Strukturgens über Katabolitrepresion kann auch auf der Ebene der Transkription nachgewiesen werden. Die Bildung von cgt-spezifischer mRNS ist nur bei Wachstum auf Stärke zu beobachten, während sie bei Kultivierung auf Glucose unterdrückt wird.

Voraussetzung für die Aufhebung der Katabolitrepresion ist die Bindung des CAP-cAMP-Komplexes an eine spezifische Binderegion

der DNS, die normalerweise (E.coli lac-Operon; Kolb et al., 1983) etwa 65 bp der Initiationsstelle der Transkription liegt. Eine solche Konsensus-Bindesequenz (de Crombrughe et al., 1984), 5'-TGTGA-3' befindet sich im Fall des cgt-Gens von K.pneumoniae 5'at 77-82 Nukleotide vor der Initiationsstelle der Transkription.

Neben der Aufhebung der Katabolitrepression ist für eine maximale Expression des cgt-Strukturgens offensichtlich zusätzlich Induktion erforderlich.

Da die langkettigen Hauptbestandteile der Stärke, Amylose und Amylopektin, nicht in die Zellen aufgenommen werden können und damit als Induktoren ausscheiden, muß man davon ausgehen, daß entweder lineare Maltooligosaccharide, die in geringen Mengen ebenfalls in der Stärke zu finden sind, oder die bei der Stärkehydrolyse aus Produkte entstehenden Cyclodextrine als Induktoren fungieren. Katabolitrepression würde im ersten Fall wegen der geringen Konzentration der kurzkettigen Maltooligosaccharide in der Stärke und im zweiten Fall aufgrund des verlangsamten Transports und/oder Abbaus der Cyclodextrine nur in geringem Maß zur Wirkung kommen.

Allerdings ist nicht auszuschließen, daß Cyclodextrine erst nach der Ringöffnung, die offenbar nicht durch die CGT selbst, sondern durch ein anderes Enzym erfolgt, und Disproportionierung, also als lineare Maltooligosaccharide, zur Induktion führen.

Die induzierende Wirkung von Maltose ist besonders stark. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die Expression des cgt-Strukturgens, ähnlich wie die des für die Pullulanase von K.pneumoniae kodierenden Gens, über einen dem malt-Genprodukt entsprechenden positiven Regulator gesteuert wird (Chapon und Raibaud, 1985). Im Fall des cgt-Gens ist jedoch keine Konsensus-Binderegion, wie sie für die regulatorischen Sequenzen anderer, auf diese Weise gesteuerter Gene beschrieben wird (z.B. pulA, malPQ, malEFG, malK-lamB, malX; Chapon und Raibaud, 1985, Raibaud et al., 1985), nachweisbar.

2. Expression des cgt-Strukturgens durch E.coli

Das cgt-Strukturgen wird auch durch E.coli ausgezeichnet expri-miert. Die Regulation der Expression des klonierten Gens erfolgt offenbar, wie in K.pneumoniae, in erster Linie über Katabolitrep-ression.

Man muß daher davon ausgehen, daß die für die Steuerung der Gen-expression verantwortlichen regulatorischen Sequenzen auch von E.coli erkannt werden.

Tatsächlich befindet sich vor dem Initiationskodon eine für E.coli typische Ribosomenbindestelle (Stormo et al., 1982). In der 3'-flankierenden Sequenz des cgt-Strukturgens erscheint eine palindrome Basenfolge, wie sie für eine rho-unabhängige Termina-tion der Transkription durch E.coli gefordert wird (Rosenberg und Court, 1979).

Der Bereich vor der Initiationsstelle der Transkription enthält jedoch keine Basenfolge, die Homologien zu E.coli-Promotoren auf-weist. Einer zwischen Initiationsstelle der Transkription und Ribosomenbindungsstelle gelegenen sechsfach wiederholten Hexa-nukleotidsequenz 5'-TTGTAG-3' konnte bislang noch keine Funktion zugeordnet werden, eine Beteiligung an der Regulation der Gen-expression ist jedoch möglich.

3. Sekretion von CGI

Unter Bedingungen, die eine Expression des cgt-Strukturgens erlauben, wird das Enzym als 655 Aminosäuren langes Vorläufer-protein mit einem Molekulargewicht von 72.916 synthetisiert und unter Abspaltung eines Signalpeptids von 30 Aminosäuren Länge durch beide Membranen aus der Zelle ausgeschleust. Das Molekular-gewicht der reifen, in das Kulturmedium sezernierten CGI beträgt 69.029.

Das Enzym wird auch von E.coli sezerniert, allerdings in gerin-gerem Maß als von K.pneumoniae.

Das Signalpeptid weist keine wesentlichen Unterschiede zu denen anderer Proteine auf, die von E.coli nicht in das Kulturmedium sezerniert, sondern nur ins Periplasma bzw. in die äußere Membran transportiert werden (Perlman und Halvorson, 1983). Daher beruht die Sekretierbarkeit der CGT offensichtlich nicht allein auf der Struktur des Signalpeptids, sondern auch auf Strukturmerkmalen des Enzyms selbst.

Möglicherweise spielt dabei die ungewöhnliche Aminosäurezusammensetzung der CGT eine Rolle. So liegt beispielsweise der Anteil an aromatischen Aminosäuren mit 12 %, der Anteil von Serin plus Threonin mit fast 16. % relativ hoch; in manchen Fällen kommen aromatische Aminosäuren in der Primärstruktur gehäuft vor.

Bei einer Ableitung der CGT-Sekundärstruktur nach Chou und Fasman (1978) fallen einige ausgedehnte hydrophobe Bereiche auf (Abbildung 38). Diese Merkmale könnten zur Sekretierbarkeit der CGT beitragen.

Synthese und Export von CGT befähigen E.coli jedoch nicht zu einem verbesserten Wachstum mit Stärke als Kohlenstoffquelle. Die periplasmatische α -Amylase von E.coli kann Cyclodextrine spalten, allerdings nur sehr langsam (Freundlieb und Boss, 1986). Möglicherweise sind daher Transport und/oder Ringspaltung der bei der Stärkehydrolyse gebildeten Cyclodextrine die limitierenden Faktoren bei der Verwertung.

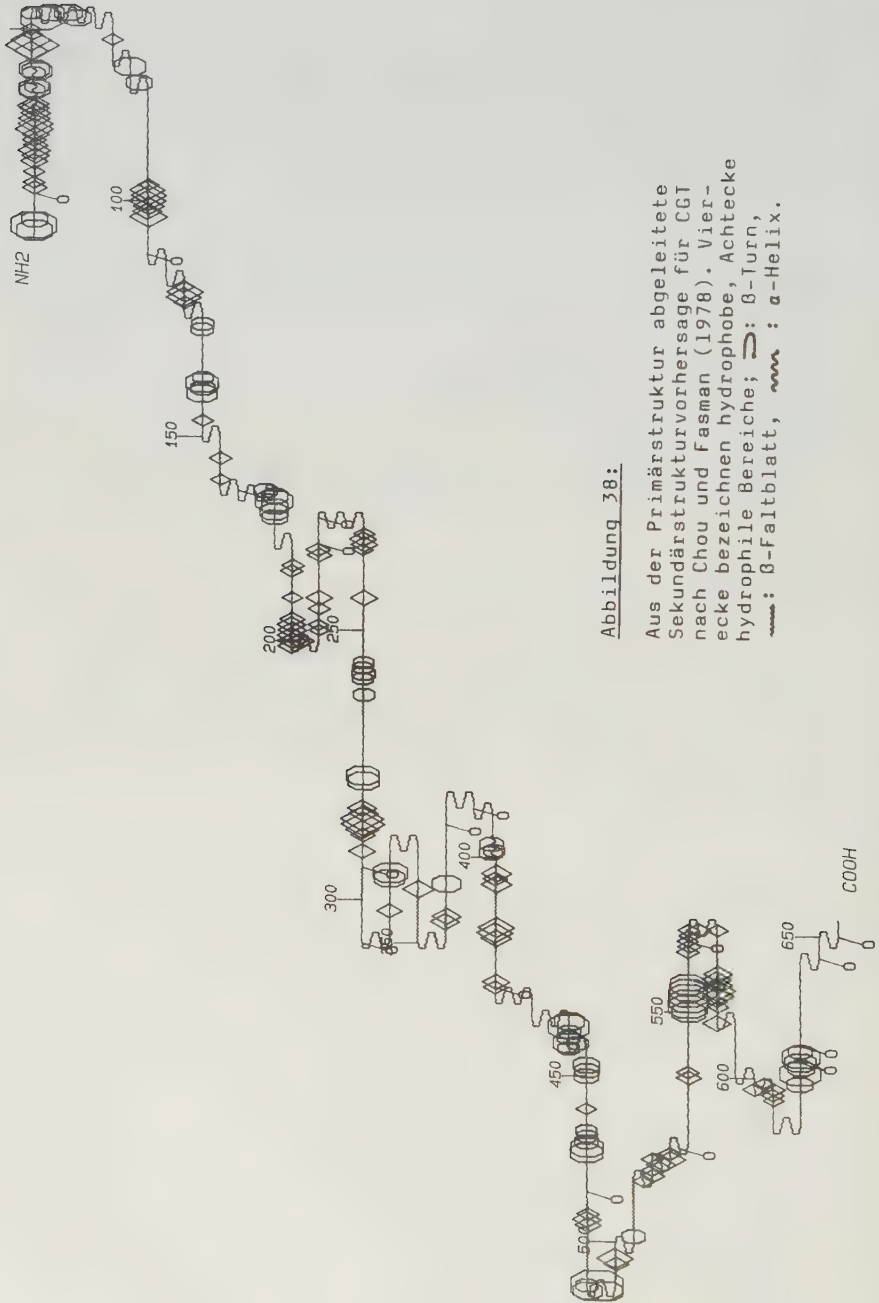


Abbildung 38:

Aus der Primärstruktur abgeleitete Sekundärstrukturvorhersage für CGI nach Chou und Fasman (1978). Vierecke bezeichnen hydrophobe, Achtecke hydrophile Bereiche; >: β-Turn, ~: β-Faltblatt, ~: α-Helix.

4. cgt in K.pneumoniae M5al: Ein lateral transferiertes Gen?

Die Synthese von CGT durch K.pneumoniae M5al weist einige Besonderheiten auf:

- K.pneumoniae M5al ist der einzige bisher bekannte gram-negative Vertreter einer ganzen Reihe von CGT-produzierenden Organismen.
- CGT wird nur von K.pneumoniae M5al und seinen Abkömmlingen (z.B. UN 1290), nicht aber von anderen K.pneumoniae-Stämmen (z.B. KAY 2026) gebildet.
- Der G+C-Gehalt des cgt-Strukturgens beträgt 39 Mol %. Im Vergleich dazu enthält Gesamt-DNS von K.pneumoniae 52-56 Mol % G+C (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974).
- Die Kodonauswahl ist für einen Vertreter der Familie der Enterobacteriaceae ungewöhnlich. Für die Kodierung zahlreicher Aminosäuren werden Tripletts verwendet, die, wie für eine Reihe von stark exprimierten Proteingenen von E.coli gezeigt wurde (Ikemura, 1981; Grosjean und Fiers, 1982), nur selten Verwendung finden (Tabelle 9).

Diese Befunde können als Hinweise dafür angesehen werden, daß K.pneumoniae M5al das cgt-Strukturgen durch lateralen Gentransfer von anderen Organismen erworben hat.

Tabelle 9: Vergleich der für die Kodierung von CGT bevorzugten mit den von E.coli zur Kodierung von in großer Menge gebildeten Proteinen primär verwendeten Triplets

Aminosäure	bevorzugt verwendete Triplets	
	für die Kodierung von CGT	für die Kodierung von E.coli Proteinen

Phe	UUU	UUC
Leu	UUA;CUA	CUG
Ile	AUU,AUA	AUC
Pro	CCU	CCA,CCG
Tyr	UAU	UAC
Gln	CAA	CAG
Asn	AAU	AAC

Für die Kodierung der Aminosäuren Val, Thr, Ala, Lys, Glu und Arg werden die gleichen Triplets wie bei E.coli-Genen bevorzugt verwendet. Im Fall von His, Asp, Cys und Ser sind die für E.coli beschriebenen Unterschiede in der Kodonauswahl zu gering, um Vergleiche ziehen zu können (Grosjean und Fiers, 1982).

Ein Zusammenhang zwischen Verfügbarkeit der jeweiligen tRNS und der Kodonauswahl wird als Regulationsmechanismus diskutiert (Ikemura, 1981; Grosjean und Fiers, 1982; Robinson et al., 1984). Danach würden für die Kodierung der Aminosäuren hoch-exprimierter Proteingene vor allem solche Triplets verwendet, für die entsprechende tRNS-Moleküle in großer Menge zur Verfügung stehen.

Um eine numerische Erfassung der Qualität der Kodonauswahl zu erhalten, wurde das Verhältnis der zur Kodierung verwendeten Tripletts, die der optimalen Auswahl von E.coli entsprechen würden, zur Gesamtzahl der benutzten Tripletts berechnet (Ikemura, 1981). Der für die CGT von K.pneumoniae errechnete f-Index von 0.47 würde dem eines von E.coli nur schwach exprimierten Proteingens entsprechen. Das cgt-Strukturgen wird jedoch sowohl durch K.pneumoniae M5al als auch durch E.coli unter entsprechenden Bedingungen relativ stark exprimiert.

Darüberhinaus konnte das cgt-Strukturgen sowohl in K.pneumoniae als auch in E.coli ohne Schwierigkeiten überexprimiert werden. Daher scheint die Bereitstellung der jeweiligen tRNS nicht der limitierende Faktor für die Expression eines Proteingens zu sein. Dieser Befund deckt sich mit den Resultaten von O'Neill et al. (1986), die ein für Cellulase kodierendes Gen aus Cellulomonas fimi mit hohem G+C-Gehalt, dessen Kodonauswahl sich ebenfalls drastisch von E.coli unterscheidet, in diesem Organismus überexprimieren konnten.

II. Homologien in der Primärstruktur von CGT aus K.pneumoniae M5al zu anderen Stärke spaltenden Enzymen

1. Homologien zur CGT anderer Bakterienstämme

Seit kurzer Zeit sind die Nukleotidsequenzen der cgt-Strukturgene zweier B.macerans-Stämme, IAM 1243 (Takano et al., 1986) und 17 A (Hayashibara, JP 228169, 1986) sowie des B.stearothermophilus-Stammes FERM-P 2225 (Hayashibara, JP 228169, 1986) bekannt.

Werden die aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Primärstrukturen dieser Enzyme mit der Aminosäuresequenz der CGT aus K.pneumoniae M5al verglichen, so können, zumindest über weite Bereiche der Sequenz, zahlreiche Regionen mit hoher Homologie beobachtet werden. Hochkonservierte Bereiche liegen vor allem in der aminoterminalen Hälfte, während sie am Carboxyterminus selten zu finden sind (Abbildung 39).

Die prozentualen Homologiewerte der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Enzyme untereinander sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Abbildung 39: Legende: Siehe nächste Seite

K.pn. 1 MKRNRFFNTSAAIAISIALNTFFCSMOTIAAEEPEETYLDRFKEI---LYFLFLDRSDDGDFCSNNA
B.m.1 1 MKSRYKRLTSLALSLSMALGISLPAWASPDTSVDNKNVNSIDVLYQIVTRDFADGDRTNNP
B.m.2 1 MKRQVKWLTSVMSVGIAGAALPVWASPDTSVNNKLNFSIDTVMQIVTRDFVDDGSANNP
B.st. 1 MRRWLSLVLSMSFVFSIAFIVSDTQKVTVFEEAGNL---NKVNTSDVVVQIVVDREVDGNTSNNP

K.pn. 63 GFNSATVTPNLLKKYIGGLRLGLINKLP---YIKSLGVTSWTTPIDNVNNTDAAG---NTGYHG
B.m.1 62 AGDAFSSDGRSNLKYFGGGWQGITLTKINDGYLTGMCVGTALWISHPVENITSVIKYSGVNNTSYHG
B.m.2 62 TGAAFSSDHSNLKYFGGGWQGITLTKINDGYLTGMCVGTALWISOPVENITAVINVSGVNTAYHG
B.st. 63 SGALFSSGCTNLKRYCGGQWQGITLTKINDGYLTDMGVTAIWISOPVENITVFSVMNDEASGSASVHG

K.pn. 123 YWCRDYFRIDEHEGMDDFKEI---TSLMHPDYNMGLMDYAPNHSNANDEN---DFGALYR
B.m.1 127 YWARDFKQTNDAFCDFADFNILDTLTLITS-----RSRLFPDQHVSGRAGTNPGFAENGALYD
B.m.2 127 YWPRDFKKTNAAGFSFTDFSNLIAAAHSHNT-----KVMDFAPNHTIPASSTDPSFAENGALYN
B.st. 128 YWARDFKKPNPFEGTSDFORLVDAAHAKGI-----KVITDFAPNHTSPASGNTNPSYMEGRLYD

K.pn. 180 LGVFITDPTNVAQANTQWYHHNGGVNWNDDFQVKNHNLNCSDLNQSNTDVQYQYLDGSKFWLLD
B.m.1 187 NGSLLGAMSNDTA---GLFHHNGG-IDFSTIEDGYKKNLWDLADINKNNNAMDAFKSAIDLWLG
B.m.2 187 NGTLLGKYSNDTA---GLFHHNGG-IDFSTSDGYKKNLYDLADINENNNTIDSYLKESQWLNL
B.st. 188 NGTLLGGYNDAN---MYFHHNGG-IDFSSLEDGIYRNLDLADLNHONPVIDRYLKVAVKMMWLD

K.pn. 245 AGVDATRIDAIKHMOKSFIOKWTSDIYDYSKISGREGFFFEWFGASANTTIGVDGNAIEYAN-
B.m.1 248 MGVDGIRFDDAVKQ-YPFGWOKS-----FVSSIIYGGDHPVFETFGEWYL---GADOTDGDGNIKF
B.m.2 248 LGVDGIRFDDAVKHM-PQGWOKS-----YVSSIIYSSANPVETFGEWFL---GPDEMTODNDNF
B.st. 249 MGTGGLRMDAVKHM-PFGWOKS-----LMDEIDNRYRPFETFGEWFL-----SENEVDANNHYF

K.pn. 309 TSCGALLDFGFEDTLERVLVCR-SGMTMKILNSYLKIKROTVFTSDDQVVFMDNHDMARIGTALR
B.m.1 301 ANESGMNLLDEYACQVREVRFRDKTETMKDLVEVLASTESQYDINNMMVFDNDHMDRFOVA---
B.m.2 301 ANESGMHLLDFAFACQVREVRFRDKSETMDLNSVISSTQSYDINNMMVVFMDNHDMDRFOQA---
B.st. 301 ANESGMSLLDFRFGELKRLQVLRNNSDNWYGYNMIEDTASAYDEVLNQVTEFDNDHMDRFD----

K.pn. 373 SNATTFGPGNNETGGSQSEAFANKRIDLGLVATMTVRGIPAIYYGTGHYAANFTSNSFGQVGSDF
B.m.1 364 -----MTGDCGDP
B.m.2 364 -----MTGDCGDP
B.st. 360 -----MTGNCDF

K.pn. 438 YNREKMPGFDTESEAFSIIKIGDLRKSSPATONGTYTBLWVNDLILVERRSNGLIIVALNRG
B.m.1 371 NNRAMTSSFNITGTTAYLVICALAPLRKSNPALAYGTTITRWVNDMLIERKFGSSAALVAINRN
B.m.2 371 NNRGMMTGFCDINKTAYLVICALAPLRKSNPALAYGSTITRWVNSDVYIERKFGSNVALVAVNRS
B.st. 366 YNREKMSSEFNKNTRAYQVLOKUSLRRNPPALAYGDETRWVNGDVYIERQFGKIVMLRVNRS

K.pn. 503 EANTINVKNIAV---PNCVYPSLIGNNSVSVANKRRTLTLMCEAVVIRSQSDDAENFTVQSSINFT
B.m.1 436 SSAAYPISGLLSSLPAGTYSVDVLNGLNGNSITVSGGAVNTFTLAAGGTAVWQYTAPGTSPAIG
B.m.2 436 STTAYPISGALTALPNTITDVLGGLNGNSITVN-GGTVSNFTLAAGGTAVWQYTTIGSSPIIG
B.st. 431 SSSNYSITGLFTALPAGTITDQLGGLLDGNTIQVGSNGSVNAFDLGPGEVGVWAYSATETSTPIIG

K.pn. 566 CNNGYTTISGQSVYIIGNIPOLGGWDLTAVKISPTQYQPWASLELPDNLNVEWCKVRNEFNFT
B.m.1 501 NVGPTMGQGNIVTIDGRFGGTACTVYFGTAVTSGGIVSWEDTQIKAVIPKVAAGTGVSVKT
B.m.2 500 NVGPTMGKPGNTITIDGRFGGTGNKVT-FGTTAVTGANIVSWEDTEIKVKVPNVAAAGNTAVVTN
B.st. 495 HVGPMMGQVGHVQVTTIDGEGFGTNTGTVKGFTTAANVVSWSNNQIVVAVPNVSPGKNYNTVQSSSG

K.pn. 631 ANVEWQSGANNFNFNNDTQITNGSF
B.m.1 566 SSGTASNTFKSFNVLTGDMVIRFLVNQANTNYGTNVLVGNAAELGTWDPNKAIGPMYNQVIAK
B.m.2 564 AAGTTSAAFNFNFNVLTDQVIRFLVKNNAATTALGQNVYLTGNVAELGNWTAANAIGPMYNQVEAS
B.st. 560 QTSAAAYDN---FEVLTDQVSVRFVFNNAATTNLGQNIYIVGNVYELGNWDTSKAIGPMFNQVVS

B.m.1 631 YPSWYY-DVSVPAGTKLDFKFIKGGGGTVTWEGGGNHTYTPASGVGTVTVDWQN
B.m.2 629 YPTWYF-DVSVPANTALQFKFIKVG-STVWEGGNHTTSPSSGVATVTVDWQN
B.st. 621 YPTWYYIDVSVPEGKTIEFKFIKDSQGNVTWESGNSNHVYTPNTNTGKIIVDWQN

Abbildung 39:

Vergleich der Primärstrukturen von Cyclodextrin-Glucosyl-Transferasen aus *Klebsiella pneumoniae* M5al (K.pn.), *Bacillus macerans* IAM 1243 (B.m.1), *Bacillus macerans* 17 A (B.m.2), *Bacillus stearothermophilus* (B.st.). Die Zahlen zeigen die Aminosäureposition, beginnend mit der N-terminalen Aminosäure des Signalpeptids, an; zur Abkürzung der Aminosäuren wurde der von der IUPAC-IUB Kommission empfohlene 1 Buchstaben-Code verwendet; homologe Bereiche der Aminosäuresequenz der CGT von *K.pneumoniae* M5al mit den Primärstrukturen der Enzyme der anderen Bakterienstämme sind durch Einrahmung hervorgehoben.

Tabelle 10: Homologie von CGT-Aminosäuresequenzen der verschiedenen Produzentenstämmen

	1	2	3	4
K.pneumoniae M5al	-			
B.macerans IAM 1243	23 %	-		
B.macerans 17 A	25 %	71 %	-	
B.stearothermophilus FERM-P 2225	22 %	52 %	54 %	-

Die Homologiewerte steigen, wie erwartet, mit dem Grad der Verwandtschaft der Organismen, erreichen aber auch bei Vergleich zweier Enzyme von Stämmen der gleichen Art nur relativ geringe Werte. Bei den Veränderungen handelt es sich allerdings häufig um konservative Austausche, so daß starke Auswirkungen auf Sekundär- und Tertiärstruktur nicht zu erwarten sind. Im Fall von CGT aus *K.pneumoniae* M5al fällt eine 61 Aminosäuren lange Sequenz auf, für die es zu den Enzymen der anderen Organismen keine Entsprechung gibt. In der Chou-Fasman-Vorhersage der Sekundärstruktur (Abbildung 38) sind keine Besonderheiten zu beobachten, weshalb dieser Region keine Funktion zugeordnet werden kann.

2. Homologien zu anderen Stärke spaltenden Enzymen

Die Aminosäuresequenz der CGT aus *K.pneumoniae* M5a1 wurde mit denen von α - und β -Amylasen verschiedenen Ursprungs (Nakajima et al., 1986; Tanaka et al., 1986) verglichen.

Nakajima et al. (1986) fanden beim Vergleich von elf verschiedenen α -Amylasen vier Regionen, in denen Aminosäuresequenz hoch konserviert ist. Sie postulieren für diese Sequenzabschnitte Funktionen als Substratbinderegionen bzw. Bereiche des aktiven Zentrums.

Wird die CGT aus *K.pneumoniae* M5a1 in diesen Vergleich mit einbezogen (Abbildung 40), so können diese Regionen auch in der CGT-Primärstruktur festgestellt werden. Die Homologien mit den Regionen 1 und 3 sind dabei allerdings sehr gering, während die Bereiche 2 und 4 offensichtlich auch in der Aminosäuresequenz der CGT relativ hoch konserviert sind. Dies gilt in gleicher Weise auch für die drei anderen CGTasen. Auch der Abstand der Regionen untereinander ist mit dem bei den α -Amylasen festgestellten vergleichbar.

Die gefundenen Homologien können dahingehend interpretiert werden, daß sich Cyclodextrin-Glycosyl-Transferasen und α -Amylasen entweder aus einem gemeinsamen Vorläufer, also divergent oder konvergent, d.h. zum gleichen Substrat hin, entwickelt haben.

Beim Vergleich der CGT-Primärstruktur mit Glucoamylasen aus drei verschiedenen Organismen, die keine Homologien mit α -Amylasen besitzen (Tanaka et al., 1986), konnten keine konservierten Regionen festgestellt werden.

Abbildung 40:

Vergleich der Primärstrukturen von CGT aus *K.pneumoniae* M5a1 (*K.pn.*) und α -Amylasen (AMY) von 8 verschiedenen Organismen: *Bacillus stearothermophilus* (*B.st.*), *Bacillus amyloliquefaciens* (*B.am.*), *Bacillus subtilis* (*B.su.*), *Aspergillus oryzae* (*A.or.*), Rattenleber (*R.L.*), Schweinepankreas (*S.P.*), Humanspeicheldrüse (*H.S.*) und Gerste (*G.*). Die Zahlen zeigen die Aminosäureposition der reifen Proteine an. Die Anordnung der einzelnen Aminosäuren folgte exakt der von Nakajima et al. (1986); die CGT-Aminosäuresequenz wurde, an den Bereichen hoher Homologie orientiert, in den Vergleich einbezogen. Die vier von Nakajima et al. beschriebenen, hochkonservierten Regionen sind eingerahmt.

Abbildung 40: Legende: Siehe vorhergehende Seite

CGT K.pn. 49 GGDRLGLINKLPYLKSLGVTSIWITPPIDNVNNTDAAGNT---GYHGYWGRDYFRIDEHFGNLLDD
 AMY B.st. 20 GTLWTKVANEANNLSSGLITLWL-PPAYKGTSRSDVGYGVVDLYDLGFEFNQKGAVRTKYGTAKQ
 AMY B.am. 17 GQHWWKRLQNDAAEHLSDIGITAVWI-PPAYKGLSQSDNGYGPYDLYDLGEFQKQGTVRTKYGTKE
 AMY B.su. 16 NWSFNTLKHNMKDIHDAGYTAIQT-SPINQVKEGNQGDKSMNSWYLYQPTSQYIGNRYLGTEQE
 AMY A.or. 36 KYCGGTWQGIIDKLDYIQMGFTA-IWITPVTAQLPQDCAYGDAYTGYWQTDIYSLNENYGTADD
 AMY R.L. 15 HLFIEWRWADIAKECERYLAPKGFG-GVQVSPPNENIINNPSRPWWERYQPISYKICSRSGNENE
 AMY S.P. 15 HLFIEWRWADIAKECERYLAPKGFG-GVQVSPPNENNVTCNPSRPWWERYQPVSYKLCSTRSGNEDE
 AMY H.S. 18 HLFIEWRWADIALECERYLAPKGFG-GVQVSPPNENVAINNPSRPWWERYQPVSYKLCSTRSGNEDE
 AMY G. 20 FHNWESWQKSGGWYNMMMGKVDDI-AAAGVTHVWLPPPSHSVSNEGYMPGRLYDIDASKYGNAAE

CGT K.pn. 111 FKELT-SLMHSPDYNMKLVLDYAPNHSNANDENEFGALY-----
 AMY B.st. 84 Y--LQ-AIQAAHAAGMQVYADVDFDHKGAGADGTVEWDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFP
 AMY B.am. 81 ---LQDAIGSLHSRNVQVYQDVVLNHHKAGADATEDVTAVEVNPANRNQETSEEYQIKAWTDFRFP
 AMY B.su. 80 F--KE-MCAAAEEYGIKVIYDAVINHTTSDYAAISNEVKS-----
 AMY A.or. 100 L--KA-LSSALHERGMYLMYDVVANHMGYDAGSGSVDSYV-----
 AMY R.L. 79 F--KD-MVTRCENNUGVRIYVDAVINHMCGSGNSAGTSTC-----
 AMY S.P. 79 F--RD-MVTRCENNUGVRIYVDAVINHMCGSGAAGTGTT-----
 AMY H.S. 82 F--RN-MVTRCENNUGVRIYVDAVINHMCGNAVSAGTSTC-----
 AMY G. 84 L--KS-LIGALHGKGVAQIADIVINHRCADYKDSRGYICI-----

CGT K.pn. 149 -----RDGVFITDYPTNVAANTGWYHHNGGVTNWNDDFFQVKNNHNLNLSDLNQSN
 AMY B.st. 146 GRGNTYSSFKRWYHFDDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKA-WDWEVDTENGNYDYLMYADLDMDHP
 AMY B.am. 143 GRGNTYSDFKWHYHFDDGADWDESRKISRIFKFRGECKA-WDWEVSSENGNYDYLMYADVDYDHP
 AMY B.su. 108 -----IPNWTGHNTQ-ICKNSDRWDVTQNSLLGLYDWNQTN
 AMY A.or. 137 -----FKPFSSQDYFHPFCFIQNYE-DQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTKD
 AMY R.L. 116 -----GSYFNPMNREFSAVPYSAWFYFNDNKC--NGE-INNYNDANQVRNCRSLGSLDLALDK
 AMY S.P. 116 -----GSYCNPGNREFPAVPYSAWDFNCNGKKTASGG-IESYNDPYQVRDGCQVLLDLALEK
 AMY H.S. 119 -----GSYFNPGSRDFPVVPYSGWDFNDGKCKTQSGSD-IENYNDATQVRDLRSLGLDLALGK
 AMY G. 138 -----CRDDTKYSDGTANLDTGADFAAAPDIDLHND

CGT K.pn. 199 TDVYQYLLDGSKFVIDAGVDAIRIDAIAKHMMDK-----SFIQKWTSDIYDYSKISIGREGFFFFGE
 AMY B.st. 210 EVVTELKSWGKWYVNTTNIDGFRDLDAVKHIKF-----SFFPDWLSDVRSQTGKPL---FTVGE
 AMY B.am. 207 DVVAETKKWGIWYANLSLDGFRIDAIAKHIKF-----SFLRDWVQAVRQATGKEM---FTVAE
 AMY B.su. 143 TQVQSYLKRFLDRALNDGADGFRFDAAKHIEL-----PDDGSYGSQFVFNITNTSAE---FOYGE
 AMY A.or. 182 VVKNEWYDWGSLVSNYSIDQLRDTVKHVQ-----KDFWPGYNAAGV---YCIGE
 AMY R.L. 170 DYVRTKQVADYMNLLIDIGVAGFRDLDAAKHIMWPGDIKAVLDKLHNLNTKWSQGSRP---FIFGE
 AMY S.P. 173 DYVRMIADYLNKLIDIGVAGFRDIDASKHIMWPGDIKAVLDKLHNLNTNWFPAGSRP---FIFGE
 AMY H.S. 176 DYVRSKIAEYMNHLIDIGVAGFRDIDASKHIMWPGDIKAILDKLHNLNSNWFPAGSKP---FIYGE
 AMY G. 121 FEGGTSQGRDLWDGPHMI-----
 AMY G. 169 RVQRELKEWLLWLKSLDGLFADLRDLDFARGYS-----PEMAKVYIDGTSPS---LAVAE

CGT K.pn. 258 WFGASANTTTGVDGNAIDYANTSGSALLDFGRDRTLRLVLVGRSGNTMKTLSYLIKQTVFTSD
 AMY B.st. 265 YWSDINKLHNYIMKTNGTMSLFDAPLHNKFTASKSGGTF-----DMRTLMTNTLMKD
 AMY B.am. 262 YWQNNAGKLENYLNKTSFQSSVFDVPLHFNLAQASSQGGY-----DMRRLDGTVVSR
 AMY B.su. 200 ILQDSASRDAAYANMDVFTASNYGHSIRSA-----LKNRN-----LGVSNISHYASDV
 AMY A.or. 230 VLDGDPAYTCPYQNVMDGVLNYPYIYPLLNAFKSTSGSMDD-----LYNMINTVKSDCP
 AMY R.L. 231 VIDLGGEAIKGYSEYFNGRVTEFYKAGLGTVIRKNTGEKM-----SYLKNWEGEGWGFV
 AMY S.P. 234 VIDLGGEAIKGYSEYFNGRVTEFYKAGLGTVIRKWSGEKM-----SYLKGPLKGWGMF
 AMY H.S. 237 VIDLGGEPIKSSDYFNGRVTEFYKAGLGTVIRKWTGEKM-----SYLKNWEEGWGMF
 AMY G. 219 WVDNMATGGDGKPNYDQDAHRQNLVNWVDKVGGAASAGMVDFDTTKGILNAAVEGELWRLIDPOG

CGT K.pn. 323 DWQ-----VVFMDNHDMA
 AMY B.st. 320 QPTLA-----VTFVDNHDTE
 AMY B.am. 317 HPEKA-----VTFVENHDTO
 AMY B.su. 248 SADKL-----VTFVESHDTY
 AMY A.or. 284 DSTLL-----GTFVENHNDP
 AMY R.L. 285 PTDRA-----LVFVDNHDNQ
 AMY S.P. 288 PSDRA-----LVFVDNHDNQ
 AMY H.S. 291 PSDRA-----LVFVDNHDNR
 AMY G. 284 KAPGVMGWWPAKAATFVDNHDTG

IV. Expression des cgt-Strukturgens unter Kontrolle heterologer Promotoren

1. Expression unter Kontrolle des tac-Promotors

Um eine Überexpression des cgt-Strukturgens zu erreichen, wurde der homologe Promotor gegen den starken, gut induzierbaren tac-Promotor (de Boer et al., 1983) ausgetauscht. Dazu wurden mehrere tac-cgt-Fusionsplasmide konstruiert, die sich in der Nukleotidsequenz zwischen Ribosomenbindestelle und Initiationskodon unterscheiden.

Die Induktion des tac-Promotors durch IPTG oder Lactose bewirkt sowohl in E.coli als auch K.pneumoniae eine Überproduktion von CGT.

Der Zweck dieser Überproduktion, nämlich den unmittelbaren Einsatz des Kulturüberstands zur Produktion von Cyclodextrinen aus Stärke zu ermöglichen, kann jedoch nicht erfüllt werden, weil die Sekretion von CGT nicht in gleichem Maß wie die Synthese gesteigert wird. Der überwiegende Teil des gebildeten Enzyms wird in den Zellen zurückgehalten.

Bei Induktion des tac-Promotors durch IPTG lassen sich, wenn K.pneumoniae als Rezipient verwendet wird, innerhalb der Zellohülle zwei Formen des Enzyms nachweisen, wobei es sich in einem Fall um Vorläuferprotein, im anderen Fall um prozessierte CGT handeln könnte.

Geht man von den normalerweise beim Export von Proteinen stattfindenden Prozessen aus (Übersichtsartikel: Pugsley und Schwarz, 1985; Holland et al., 1986), könnte die Vorläuferform membrangebunden und die prozessierte Form periplasmatisch lokalisiert sein. Die Induktion des tac-Promotors würde in diesem Fall so rasch zur Bildung von Vorläufer-CGT führen, daß die Abspaltung des Signalpeptids nicht schnell genug erfolgen kann. In der Folge würde es zu einer Blockierung der Bindestellen in der Membran und zur Destabilisierung kommen. Dies könnte der Grund für die im Verlauf der Induktion eintretende Lyse der Zellen sein.

Die Vorläufer-Form der CGT ist im Fall von *E.coli* nicht zu beobachten, obwohl bei Induktion des *tac*-Promotors mit IPTG auch hier eine Lyse der Zellen eintritt. Die Expression erfolgt offenbar langsamer, so daß eine Abspaltung des Signalpeptids möglich wird. Das reife Enzym wird jedoch möglicherweise durch die äußere Membran zurückgehalten und führt zu ihrer Destabilisierung und zur Lyse der Zellen.

Lactose induziert die Expression des *cgt*-Strukturgens offensichtlich langsamer als IPTG. Dadurch wird sowohl die Prozessierung des Vorläuferproteins als auch, wenigstens zum Teil, der Transport durch die äußere Membran ermöglicht. Demzufolge führt die Induktion durch Lactose zu erheblich höheren Sekretionsausbeuten als die Induktion durch IPTG, wobei eine Lyse der Zellen vermieden wird. Die Induktion durch Lactose führt, je nachdem, welche *tac-cgt*-Fusion getestet wird, zu starken quantitativen Unterschieden sowohl in der Synthese als auch in der Sekretion von CGT.

Die Expression des *cgt*-Strukturgens ist offensichtlich in hohem Maß von Länge und Basenfolge der Sequenz zwischen Ribosomenbindestelle und Initiationskodon abhängig. Die Exportkapazität erreicht ein Maximum, das auch durch Sequenzveränderungen in der Abstandsregion nicht mehr gesteigert werden kann.

Das Ziel, eine Verbesserung der CGT-Sekretion durch eine Veränderung der Signalsequenz zu erreichen, wurde durch Austausch eines im Signalpeptid lokalisierten Cysteinrests gegen Alanin nicht erreicht. Der Austausch hat keinen Einfluß auf die Sekretierbarkeit des Enzyms, was darauf hinweist, daß die CGT nicht wie die Pullulanase von *K.pneumoniae* (Pugsley et al., 1986) über eine Lipoprotein-Vorstufe sezerniert wird.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten Ausbeuten an sezerniertem Enzym von maximal 25 mg/l aus *K.pneumoniae* bzw. 40 mg/l aus *E.coli* erzielt werden. Im zweiten Fall ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Ausschleusung auf eine unspezifische, durch die Menge des im Periplasma lokalisierten Enzyms bedingte, partielle Destabilisierung der äußeren Membran zurückzuführen ist.

Um eine Interaktion der CGT mit den Membranen und die damit verbundene Lyse der Zellen zu vermeiden, wurde der für das Signalpeptid kodierende DNS-Abschnitt über Oligonukleotidmutagenese deletiert, die für die reife CGT kodierende Nukleotidsequenz um ein Initiationskodon verlängert und mit dem tac-Promotor fusioniert.

Die Induktion des tac-Promotors sowohl durch IPTG als auch durch Lactose führt im Fall dieses Fusionsplasmids zu einer intrazellulären Überproduktion von CGT. Dabei kommt es nicht zu einer Lyse der Zellen, das überproduzierte Enzym wird jedoch, sowohl in *K.pneumoniae* als auch in *E.coli*, zum größten Teil in der Zelle ausgefällt und in Form unlöslicher, enzymatisch inaktiver Einschlusskörperchen eingelagert. Die unlösliche Enzymfraktion läßt sich nach einer von Marston et al. (1984) ausgearbeiteten Methode unter denaturierenden Bedingungen quantitativ in Lösung bringen und durch Entfernung des denaturierenden Agens teilweise zur aktiven CGT regenerieren. Die Regeneration der CGT-Aktivität erfolgt jedoch mit sehr niedriger Effizienz.

Möglicherweise könnten sich Bedingungen erarbeiten lassen, die die Ausbeuten an renaturiertem Enzym erheblich steigern würden. Der technische Aufwand wäre jedoch für eine Anwendung in industriellem Maßstab zu kostenintensiv. Ein eher gangbarer Weg scheint daher der Versuch zu sein, die massive Anhäufung von CGT und die damit verbundene Bildung von Einschlusskörperchen zu umgehen. Dies könnte z.B. durch eine extrem langsame Zudosierung des Induktors, die eine stufenweise Expression des *cgt*-Strukturgens nach sich ziehen würde, geschehen.

2. Expression des *cgt*-Strukturgens in *B.subtilis* unter Kontrolle des *spac I*-Promotors

Da offensichtlich auch die äußere Membran von *E.coli* bzw. *K.pneumoniae* eine sehr wesentliche Barriere für die Sekretion von CGT darstellt, sollte die Überproduktion von CGT in *B.subtilis*, dem diese Membran fehlt, zu erheblich besseren Exportausbeuten führen. Da die zur Verfügung stehenden *E.coli*-Plasmide in *B.subtilis* nicht replizierbar und Gene über den tac-Promotor nur schlecht exprimierbar sind, wurde zur Expression des *cgt*-Strukturgens ein

von Yansura und Henner (1984) konstruierter Vektor mit dem induzierbaren *spacI*-Promotor verwendet.

Es wurden zwei *spacI*-*cgt*-Fusionsplasmide mit unterschiedlichem Abstand zwischen Ribosomenbindestelle und Initiationskodon des *cgt*-Strukturgens konstruiert.

Die Induktion durch IPTG führt zur Expression des *cgt*-Strukturgens in *B.subtilis*. Die induzierbare Bildung von CGT ist auch in *E.coli* möglich, da der Vektor in beiden Organismen replizierbar ist und der Promotor auch von der *E.coli*-RNS-Polymerase erkannt werden kann (Yansura und Henner, 1984).

Die Expression des *cgt*-Strukturgens sowohl in *B.subtilis* als auch *E.coli* erreicht jedoch trotz des, zumindest in einem Fall, günstigen Abstands zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und Initiationskodon nur relativ niedrige Werte. Darüberhinaus läßt die hohe Instabilität des Vektors und der mit seiner Hilfe konstruierten Fusionsplasmide eine Anwendung in großem Maßstab nicht sinnvoll erscheinen.

IV. Schlußbetrachtung und Zukunftsperspektiven

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe gentechnologischer Methoden eine Überproduktion von CGT durch Mikroorganismen in einer Weise zu erreichen, die zur Senkung der Herstellungskosten von Cyclodextrinen beitragen würde, konnte nur in Teilbereichen verwirklicht werden.

Eine Überexpression des *cgt*-Strukturgens konnte zwar erzielt werden, ein Einsatz des Genprodukts zur großtechnischen Produktion von Cyclodextrinen ist jedoch aus den dargestellten Gründen nicht möglich.

Um dieses Ziel zu erreichen, dürfte der am einfachsten gangbare Weg über eine Verbesserung der Sekretion der überproduzierten CGT führen.

Dafür gibt es mehrere Alternativen:

Eine Verbesserung der Sekretion mit Hilfe gentechnologischer Methoden könnte zum Beispiel über gezielte Veränderungen des

Signalpeptids, die eine schnellere Prozessierung des Vorläuferproteins nach sich ziehen, erfolgen (Kendall et al., 1986). Auch eine Überexpression in *B. subtilis* könnte, wenn taugliche Vektoren zur Verfügung stehen, einen Export in gewünschtem Maß bedingen.

Alternativ dazu könnte das Problem auch über unspezifische Mutagenese der tac-cgt-Fusionsplasmide und/oder der Rezipientenstämmen in Richtung auf eine verbesserte Sekretion gelöst werden. Ein solcher Weg wurde für α -Amylasen in verschiedenen *Bacillus*-Stämmen erfolgreich beschritten (Maruo und Tojo, 1985; Kanno, 1986). Dabei wurden in mehreren Mutageneseschritten Mutanten mit jeweils höherer Resistenz gegen D-Cycloserin isoliert. Eine Verbesserung der Sekretion konnte parallel zu steigender Cycloserinresistenz beobachtet werden. Die Gründe dafür sind noch unbekannt (Maruo und Tojo, 1985).

In gleicher Weise wurden bereits Experimente mit tac-cgt-Fusionsplasmiden in *E. coli* DS 410 und *K. pneumoniae* RC 10 durchgeführt (W. Seydel, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München). Im Lauf dieser Experimente konnte die Ausbeute an sezernierter CGT auf über 100 mg/l gesteigert werden. Eine weitere Verbesserung der Sekretion scheint auf diesem Weg durchaus möglich zu sein.

E. Zusammenfassung

Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Bereitstellung eines Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase überproduzierenden Organismus zu einer Senkung der Kosten für die Herstellung von Cyclodextrinen aus Stärke beizutragen.

Die Aufklärung von Struktur und Expression des für die CGT von *Klebsiella pneumoniae* M5a1 kodierenden Gens sollte die Voraussetzung für eine Steigerung der Syntheserate über gezielte gentechnologische Eingriffe schaffen.

Die dabei erhaltenen Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

-CGT wird als Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von 72.916 synthetisiert und unter Abspaltung eines 30 Aminosäuren langen Signalpeptids in das Kulturmedium sezerniert. Das Enzym liegt dort als monomeres Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 69.029 vor.

Synthese und Sekretion von CGT können auch durch *E.coli* erfolgen.

-Die Primärstruktur der CGT von *K.pneumoniae* M5a1 weist Homologien bis zu 25 % zu denen verschiedener *Bacillus*-Stämme auf. Beim Vergleich mit den Aminosäuresequenzen von α -Amylasen verschiedenen Ursprungs finden sich Homologien in Bereichen, die als Substratbindestelle bzw. aktives Zentrum fungieren könnten.

-Die erhaltenen Daten weisen darauf hin, daß *K.pneumoniae* M5a1 das cgt-Strukturgen durch lateralen Gentransfer aus einem anderen Organismus erhalten haben könnte.

-Die Synthese von CGT unterliegt einer strikten Regulation. Zur maximalen Expression des cgt-Strukturgens ist neben der Aufhebung der Katabolitrepresion Induktion erforderlich. Als Induktoren können neben Cyclodextrinen auch lineare Oligosaccharide, insbesondere Maltose, fungieren.

Die Überproduktion von CGT sollte durch Austausch der homologen Expressionssignale gegen starke und gut regulierbare Promotoren erreicht werden.

Die dabei erzielten Resultate stellen sich wie folgt dar:

-Die Expression des cgt-Strukturgens mit Hilfe des tac-Promotors führt zur gesteigerten Synthese des Enzyms sowohl in *K.pneumoniae* als auch *E.coli*. Der Anteil der gebildeten CGT am Gesamtprotein der Zelle erreicht Werte bis zu 26 %. Der überwiegende Teil des Enzyms wird jedoch nicht in das Kulturmedium sezerniert, sondern innerhalb der Zellhülle zurückgehalten.

Die Expression des cgt-Strukturgens nach Deletion der Signalsequenz zieht eine intrazelluläre Überproduktion des Enzyms nach sich. Die CGT wird in diesem Fall jedoch in Form unlöslicher, enzymatisch inaktiver Einschlusskörperchen in die Zellen eingelagert. Eine partielle Regeneration der Enzymaktivität nach Solubilisierung der Einschlusskörperchen ist möglich, aber sehr ineffizient.

-Das cgt-Strukturgen kann mit Hilfe des *spacI*-Promotors auch in *Bacillus subtilis* exprimiert werden. Eine industrielle Anwendung ist jedoch, vor allem aufgrund der Instabilität des zur Verfügung stehenden Vektors, nicht möglich.

Aus den dargestellten Gründen kann das überproduzierte Enzym nicht zur industriellen Herstellung von Cyclodextrinen eingesetzt werden. Dieses Ziel kann jedoch durch eine Verbesserung der CGT-Sekretion über Mutagenesen von Expressionsplasmiden und/oder Rezipientenstämmen und stufenweise Erhöhung der Cycloserinresistenz erreicht werden.

F. LITERATUR

Advances in Enzyme Technology; Technical Insights, Inc.,
Fort Lee, NY (1984)

Amman E., Brosius J, Ptashne M (1983) Gene 25: 167-178

Applied Biosystems User Bulletin, Jssue N°13 (1984)

Beauclerk AAD, Hummel H, Holmes DJ, Böck A, Cundliffe E (1985)
Eur. J. Biochem. 151: 245-255

Bender H (1977a) Arch. Microbiol. 111: 271-282

Bender H (1977b) Arch. Microbiol. 113: 46-56

Bender H (1978) Carbohydr. Res. 65: 85-97

Bender H (1980) Carbohydr. Res. 78: 147-162

Bender H (1981) Proceedings of the First International
Symposium on Cyclodextrins, Budapest 1981 (J. Szejtli ed.);
D. Reichel, Publishing Company, Dordrecht, Boston, London

Bender H (1982) Carbohydr. Res. 101: 279-285

Benson SA (1984) Bio Techniques, March/April: 66-67

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Ausgabe (1974);
Williams & Wilkins Company, Baltimore

Berk AJ., Sharp PA (1977) Cell 12: 721-732

Binder F (1984) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Birnboim HC, Doly J (1979) Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523

- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC (1977)
Gene 2: 95-113
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) J. Mol. Biol. 41: 459-472
- Brosius J (1984) Gene 27: 151-160
- Brosius J (1984) Gene 27: 161-172
- Casey J, Davidson N (1977) Nucleic Acids Res. 5: 1539-1543
- Chang JY, Brauer D, Wittmann-Liebold B (1978) FEBS Letters
93: 205-214
- Chang S, Cohen SN (1979) Molec. Gen. Genet. 168: 111-115
- Chapon C, Raibaud O (1985) J. Bacteriol. 164: 639-645
- Chen YE, Seeburg PH (1985) DNA 4: 165-170
- Chou PY, Fasman GD (1978) in: Advances in Enzymology, Vol.
17 (Meister A ed.), Academic Press, NY
- Clewell DB, Helinski DR (1972) J. Bacteriol. 110: 1135-1146
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
69: 2110-2114
- Corfield VA, Reid SJ, Bodmer J, Thompson JA (1984)
Gene 30: 17-22
- Covarrubias L, Cervantes L, Covarrubias A, Sobéron X, Vichido I,
Blanco A, Kupersztoch-Portuoy YM, Bolivar F (1981)
Gene: 13: 25-35
- Craik CS, Largman C, Fletcher I, Roczniak S, Barr PJ,
Fletterick R, Rutter WJ (1985) Science 228: 291-297

De Boer HA, Comstock LJ, Vasser M (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25

De Crombrugghe B, Busby S, Buc H (1984) Science 224: 831-838

De Pinto JA, Campbell LL (1968) Biochemistry 7: 114-120

Dougan G, Sherratt D (1977) Mol. Gen. Genet. 151: 151-160

Fraenkel DG, Neidhardt FC (1961) Biochim. Biophys. Acta 63: 96-100

Freundlieb S, Boos W (1986) J. Biol. Chem. 261: 2946-2953

Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH (1977) Methods in Immunology, Benjamin WA Inc., Reading, Massachusetts

Gray CP, Sommer P, Polke C, Beck E, Schaller H (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 50-53

Grosjean H, Fiers W (1982) Gene 18: 199-209

Hayashibara (1986) JP 228169

Hennecke H, Günther I, Binder F (1982) Gene 19: 231-234

Holland B, Mackmann N, Nicaud JM (1986) Bio/Technology 4: 427-431

Horikoshi K, Nakamura N, Matsuzawa N, Yamamoto M (1981) Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins, Budapest 1981 (J. Szejtli ed.); D. Reidel, Publishing Company, Dordrecht, Boston, London

- Horikoshi K, Akiba T (1982) Alkalophilic Microorganisms;
Japan Scientific Societies Press, Tokyo; Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York
- Horikoshi K, Nakamura N, Shinoda A, Iwasaki S, Miwa T (1983)
Twenty Eighth Technology Prize pp. 47-52
- Howe JG, Hershey JWB (1981) J. Biol. Chem. 256: 12836-12839
- Ikemura T (1981) J. Mol. Biol. 151: 389-409
- Ish-Horowicz H, Burke JF (1981) Nucleic Acids Res. 9: 2989-2998
- Johnson DA, Gantsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984)
Gene Anal. Techn. 1: 3-8
- Kanno M (1986) Agric. Biol. Chem. 50: 2633-2635
- Kato T, Horikoshi K (1986) Agric. Biol. Chem. 50: 2161-2162
- Kempf W, Tegge G, Wilhelm E (1985) Umschau 3: 144-148
- Kendall DA, Bock SC, Kaiser ET (1986) Nature 321: 706-708
- Kitahata S, Okada S (1974) Agric. Biol. Chem. 38: 2413-2417
- Kitahata S, Tsuyama N, Okada S, (1974) Agric. Biol. Chem.
38: 387-393
- Kobayashi S, Kainuma K, Suzuki S (1977) Agric. Biol. Chem.
51: 691-698
- Kobayashi S, Kainuma K, Suzuki S (1978) Carbohydr. Res.
61: 229-238
- Kolb A, Spassky A, Chapon C, Blazy B, Buc H (1983) Nucleic Acids
Res. 11: 7833-7852

- Kramer W, Drutsa V, Jansen HW, Kramer B, Pflugfelder M, Fritz HJ
(1984) *Nucleic Acids Res.* 24: 9441-9456
- Kramer B, Kramer W, Fritz HJ (1984) *Cell* 38: 879-887
- Laemmli UK (1970) *Nature* 227: 680-685
- Laemmli UK, Favre M (1973) *J. Mol. Biol.* 80: 575-599
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker (1977)
Biochemistry 16: 4743-4751
- Mac Neil T, Mac Neil D, Roberts GP, Supiano MA, Brill WJ (1978)
J. Bacteriol. 136: 253-266
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular Cloning;*
Cold Spring Harbour Laboratory; Cold Spring Harbour, NY
- Marmur J (1961) *J. Mol. Biol.* 3: 208-218
- Marston FAO, Lowe PA, Doel MT, Shoemaker JM, White S, Angal S
(1984) *Bio/Technology* 2: 800-804
- Marno B, Tojo T (1985) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31: 323-328
- Maxam AM, Gilbert W (1980) *Methods in Enzymology* 65: 499-560
- Meselson M, Yuan R (1968) *Nature* 217: 1110-1114
- Messing J (1983) *Methods in Enzymology* 101: 20-78
- Messing J, Crea R, Seeburg PH (1981) *Nucleic Acids Res.*
9: 309-321
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics; Cold Spring*
Harbour Laboratory; Cold Spring Harbour, NY

- Muraki M, Jigami Y, Tanaka H, Harada N, Fumitaka K, Agui H,
Ogino S, Nakasato S (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50: 713-723
- Nakajima R, Imanaka T, Aiba S (1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
23: 355-360
- Nomoto M, Shew DC, Chen SJ, Yen TM, Liao CW, Yang CP (1984)
Agric. Biol. Chem. 48: 1337-1338
- Norman BE (1979) *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*
(Berkeley RCW, Gooday GW, Ellwood DC eds.) Academic Press,
London, New York, San Francisco
- O'Neill GP, Kilburn DG, Warren RAJ, Miller RC Jr. (1986) *Appl.*
and Environm. Microbiol. 52: 737-743
- Peacock AG, Dingmann CW (1969) *Biochemistry* 7: 668-674
- Perlman D, Halvorson HO (1983) *J. Mol. Biol.* 167: 391-409
- Piepersberg A, Hennecke H, Engelhard M, Nass G, Böck A (1975)
J. Bacteriol. 124: 1482-1488
- Pugsley AP, Chapon C, Schwartz M (1986) *J. Bacteriol.*
166: 1083-1088
- Pugsley AP, Schwartz M (1985) *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 3-38
- Raibaud O, Gutierrez C, Schwartz M (1985) *J. Bacteriol.*
161: 1201-1208
- Robinson M, Lilley R, Little S, Entage JS, Yarranton G,
Stephens P, Millican A, Eaton M, Humphreys G (1984)
Nucleic Acids Res. 17: 6663-6671
- Rosenberg M, Court D (1979) *Ann. Rev. Genet.* 13: 319-353

- Saier MH (1985) Mechanisms and Regulation of Carbohydrate Transport in Bacteria; Academic Press, London, New York, San Francisco
- Saito H, Miura K.J. (1963) Biochim. Biophys. Acta 72: 619-629
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467
- Sanraku Ocean (1983) EP 80101818.5
- Schaffner M (1976) Cell 8: 471-478
- Schenk TE, Rhodes C, Rigby PWJ, Berg P (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 989-993
- Schmid G, Böck A (1984) System. Appl. Microbiol. 5: 1-10
- Schoner RG, Ellis LF, Schoner BE (1985) Bio/Technology 3: 151-154
- Schwimmer S, Garibaldi JA (1952) Cereal. Chem. 29: 108-122
- Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973) Biochemistry 12: 3055-3063
- Shibuya I, Iimura Y, Ishikawa T, Ouchi K, Matsuyama A, Yamamoto T, Morkawa M, Nishiya T (1986) Agric. Biol. Chem. 50: 875-882
- Southern EM (1975) J. Mol. Biol. 98: 503-517
- Sprenger GA, Lengeler JW (1984) J. Bacteriol. 157: 39-49
- Stormo GD, Schneider TD, Gold LM (1982) Nucleic Acids Res. 10: 2971-2995

- Szeijtli J. (1982) Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes;
Akadémiai Kiadó, Budapest
- Takano T, Fukuda M, Monma M, Kobayashi S, Kainuma K, Yamane K
(1986) J. Bacteriol. 166: 1118-1122
- Tanaka Y, Ashikara T, Nakamura N, Kiuchi N, Shibano Y, Amachi T,
Yoshizumi H (1986) Agric. Biol. Chem. 50: 965-969
- Thoma JA, Koshland DE Jr. (1960) J. Amer. Chem. Soc.
82: 3329-3333
- Weaver RF, Weissmann C (1979) Nucleic Acids Res. 7: 1175-1193
- Weislander L (1979) Anal. Biochem. 98: 305-309
- Wich G, Hummel H, Jarsch M, Bär U, Böck A (1986) Nucleic Acids
Res. 14: 2459-2479
- Williams BG, Blattner FR (1980) Genetic Engineering, Vol. 2
(Setlow JK, Hollaender A eds.) Plenum Press, NY, London
- Winkler ME, Blaber M, Bennet GL, Holmes W, Vehar GA (1985)
Bio/Technology 3: 990-1000
- Wittmann-Liebold B, Kimura M (1984) Methods in Molecular
Biology, Vol. 1 (Walker JM ed.) The Humana Press Inc.
- Yamazaki H, Ohmura K, Nakayama A, Takeichi Y, Otozai K,
Yamasaki M, Tamura G, Yamane K (1983) J. Bacteriol.
156: 327-337
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Gene 33: 103-119
- Yansura DG, Henner DJ (1984) Genetics and Biotechnology of
Bacilli (Ganesan AT, Moch JA, eds.) Academic Press, 1984

Mein herzlicher Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. A. Böck, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, für die vielfältige Unterstützung und wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil werden ließ. Es war für mich ein Ansprechpartner, der mir stets gerne mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frl. Gabi Heller bin ich für die ausgezeichnete technische Assistenz bei zahlreichen Experimenten sehr dankbar.

Dem Consortium für elektrochemische Industrie, GmbH, München danke ich für die finanzielle und technische Hilfe. Insbesondere Herrn Dr. G. Schmid bin ich für die Durchführung von Enzymtests und viele Tips, die er mir im Verlauf der Arbeit gab, zu Dank verpflichtet.

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Mikrobiologie möchte ich mich für das gute Betriebsklima und viele Anregungen und Hilfestellungen bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich Frl. Brigitte Auer sehr herzlich dafür danken, daß sie es auf sich genommen hat, die Reinschrift dieser Arbeit anzufertigen.

Lebenslauf

Name: Florian Ulrich Binder
Geburtsdatum, Geburtsort: 27.05.1957, München
Eltern: Max Binder, Kaufmann
Elfriede Binder, Hausfrau

Ausbildung:

1963-1967 . Grundschule in Traunstein
1967-1976 Neusprachliches Gymnasium
in Traunstein, Abitur
1976-1977 Grundwehrdienst
1977-1984 . Studium der Biologie an der
Ludwig-Maximilian-Universität,
München, Diplom
1984-1987 Bearbeitung der vorliegenden
Dissertation am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der Universität
München unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. A. Böck

